



**Carolina Isabel
Maia Rocha**

Papel da Neuregulina na Hipertensão Arterial Pulmonar





**Carolina Isabel
Maia Rocha**

Papel da Neuregulina na Hipertensão Arterial Pulmonar

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Carmen Dulce da Silveira Brás Silva Ribeiro, Investigadora do Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorádica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, e coorientação científica da Professora Doutora Paula Gonçalves, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof.^a Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof.^a Doutora Carmen Dulce da Silveira Brás Silva Ribeiro
Investigadora do Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Coorientador

Prof.^a Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora Associado do Departamento de Biologia Universidade de Aveiro

Arguente

Prof.^a Doutora Ana Patrícia Nunes Fontes Sousa
Professora Auxiliar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Agradecimentos

À Professora Doutora Carmen Brás-Silva, minha orientadora, pela oportunidade profissional de trabalhar no seu grupo, orientação e conhecimentos partilhados.

À Professora Doutora Paula Gonçalves por todo o apoio, disponibilidade e simpatia demonstrada ao longo de todo este processo académico.

Aos meus colegas e amigos, Dr. Pedro Ferreira e Dr. Rui Adão que sempre me auxiliaram com todo o suporte técnico e logístico nos diversos processos de análise laboratorial.

Às colegas Dr.^a Maria José Mendes e Dr.^a Maria Pedro, pela valiosa colaboração prestada em todo este projeto.

Ao Prof. André Lourenço, Prof.^a Sónia Pinho e Dr. Francisco Nóvoa, pela troca de conhecimento, informações e apoio técnico fundamental na concretização desta investigação.

Ao Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, em especial ao Professor Doutor Adelino Leite Moreira por disponibilizarem os meios logístico e humanos, sem os quais esta investigação não teria sido possível.

A todos os colegas e funcionários do Serviço de Fisiologia, pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram e pela partilha de experiências.

Em especial à minha Família, pelo investimento que fizeram em mim, pelo incansável apoio e coragem que me deram, e pela compreensão e paciência que demonstraram ao longo de toda esta etapa da minha vida.

A todos o meu sincero...
... muito obrigado!

Palavras-chave

Hipertensão arterial pulmonar, insuficiência cardíaca, neuregulina-1, recetores ErbB, monocrotalina, função miocárdica.

Resumo

A Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma patologia das artérias pulmonares, que envolve diversas vias bioquímicas e diferentes tipos celulares, sendo caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar, com sobrecarga progressiva do ventrículo direito (VD), acabando por conduzir a um estado de insuficiência cardíaca (IC) ventricular direita. Apesar do constante desenvolvimento de novos fármacos, esta condição complexa e multifatorial permanece sem cura e com um prognóstico muito aquém do desejável. A neuregulina-1 (NRG-1) pertence à família das glicoproteínas, semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF), e desempenha um importante papel a nível celular, tanto durante o desenvolvimento como no coração adulto. A NRG-1 tem sido implicada na fisiopatologia da IC ventricular esquerda e em processos a nível pulmonar, contudo, até à data, não existem estudos relativos ao papel desta proteína na HAP e progressão para a IC direita. Nesse sentido, foi nosso objetivo estudar o papel do sistema NRG-1 na fisiopatologia da HAP e IC direita.

Ratos Wistar machos (180-200g) receberam aleatoriamente 60mg/Kg de monocrotalina (MCT) ou de veículo. Após 14 dias, estes animais foram tratados aleatoriamente com NRG-1 (40µg/Kg/dia) ou com volume equivalente de veículo. Deste estudo resultaram 4 grupos: controlo (CTRL); CTRL+NRG-1; MCT e MCT+NRG-1. Entre o 25º e o 28º dias após administração de MCT, procedeu-se à avaliação ecocardiográfica, hemodinâmica e à colheita de amostras para posterior análise funcional vascular, morfométrica, histológica e molecular.

O grupo MCT desenvolveu HAP, traduzida pelo aumento da pressão sistólica do VD e diminuição do débito cardíaco. Por avaliação ecocardiográfica e hemodinâmica *in vivo*, foi possível comprovar alterações geométricas do VD com consequente comprometimento da função ventricular, no grupo MCT. A nível morfométrico e histológico foi possível observar a hipertrofia do VD e aumento da congestão pulmonar, enquanto no estudo funcional das artérias pulmonares foi possível verificar disfunção endotelial. Verificou-se também um aumento dos níveis do péptido natriurético tipo B (BNP) e endotelina-1 (ET-1) no VD, bem como de interleucina 6 (IL6) no pulmão dos animais MCT.

A administração crónica de NRG-1 atenuou todos os parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos medidos. Foi possível verificar que a NRG-1 reduziu o estado de hipertrofia e dilatação do VD, a congestão pulmonar e melhorou a função vascular pulmonar. O tratamento crónico reduziu significativamente o grau de HAP e a hipertrofia do VD, bem como a ativação de genes associados a sobrecarga e hipertrofia ventriculares. Estes resultados sugerem que o sistema NRG-1/ErbB desempenha um importante papel na fisiopatologia da HAP e IC ventricular direita, podendo assim constituir um potencial alvo terapêutico.

Keywords

Pulmonary arterial hypertension, heart failure, neuregulin-1, ErbB receptors, monocrotaline, myocardial function.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease of the pulmonary arteries, which involves several different biochemical pathways and cell types. This is characterized by increased pulmonary vascular resistance, with progressive overload of the right ventricle (RV), eventually leading to a state of heart failure (HF). Despite the constant development of new drugs, this complex and multifactorial condition remains incurable and the prognosis continues far from desirable. The neuregulin-1 (NRG-1) belongs to the family of glycoproteins, similar to epidermal growth factor (EGF), and plays an important role at the cellular level, both during development and in the adult heart. NRG-1 has been implicated in the pathophysiology of left ventricular HF and in the lung processes, however, to date, there are no studies concerning the role of this protein in PAH and the progression of right HF. Our aim was to study the role of the NRG-1 in the pathophysiology of PAH and right HF.

Male Wistar rats (180-200g) randomly received an injection of 60mg/kg of monocrotaline (MCT) or vehicle. After 14 days, these animals were randomly treated with NRG-1 (40µg/Kg/dia) or an equal volume of vehicle. This study resulted in four experimental groups: control (CTRL), CTRL + NRG-1, MCT and MCT + NRG-1. Between the 25th and 28th days after administration of MCT, we proceeded to echocardiography and hemodynamic evaluation, and to the collection of samples for subsequent functional vascular, morphometric, histological and molecular analysis.

The MCT group developed PAH, as reflected by the increase in RV systolic pressure and decreased cardiac output. Hemodynamic and echocardiography evaluation *in vivo* showed geometric changes of the RV, with consequent impairment of ventricular function, in the MCT group. At the morphometric and histological levels we observed increased RV hypertrophy and pulmonary congestion, while the functional study of pulmonary artery revealed endothelial dysfunction. An increase in levels of B-type natriuretic peptide (BNP) and endothelin-1 (ET-1) in the RV, as well as interleukin-6 (IL6) in the lung, was also observed in MCT animals. Chronic administration of NRG-1 attenuated all echocardiography and hemodynamic alterations observed in MCT animals. NRG-1 reduced the state of hypertrophy and dilatation of the RV, pulmonary congestion and improved pulmonary vascular function.

In conclusion, chronic treatment with NRG-1 reduced the degree of PAH and RV hypertrophy, as well as activation of genes associated with overload and ventricular hypertrophy. These results suggest that the NRG-1/ErbB system plays an important role in the pathophysiology of PAH and right ventricular HF and may thus represent a potential therapeutic target.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	11
1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	13
1.1 DEFINIÇÃO	13
1.2 CLASSIFICAÇÃO	13
1.3 EPIDEMIOLOGIA	15
1.4 FATORES DE RISCO	16
1.5 FISIOPATOLOGIA	17
1.5.1 Alterações celulares	18
1.5.1.1 Células musculares lisas e fibroblastos	18
1.5.1.2 Células endoteliais	19
1.5.1.3 Células inflamatórias	20
1.5.1.4 Plaquetas	21
1.5.2 Mecanismos moleculares	21
1.5.2.1 Canais de potássio	22
1.5.2.2 Prostaciclina	22
1.5.2.3 Óxido nítrico	22
1.5.2.4 Endotelina-1	23
1.5.3 Envolvimento da função ventricular direita	25
1.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS	27
1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HAP	27
2. NEUREGULINAS	29
2.1 NEUREGULINA 1	29
2.2 RECEPTORES ERBB	31
2.2.1 Ativação dos receptores ErbB	32
2.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA NRG-1/ERBB	33
2.4 PAPEL DA NRG-1 NO SISTEMA CARDIOVASCULAR	34
2.4.1 NRG-1 no desenvolvimento cardíaco	35
2.4.2 NRG-1 no coração adulto	35
2.4.2.1 Efeitos a nível dos cardiomiócitos	36
2.4.2.2 Interação com mediadores neuro-humorais	36
2.4.2.3 NRG-1 e insuficiência cardíaca	37
2.5 NRG-1 NA HAP E NO DESENVOLVIMENTO DE IC VENTRICULAR DIREITA	39
CAPÍTULO II	41
3. OBJETIVOS	43
CAPÍTULO III	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 MODELO ANIMAL	47
4.2 ESTUDOS FUNCIONAIS	49
4.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO E HISTOLÓGICO	52
4.4 ESTUDO MOLECULAR	53

4.5	ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO	55
-----	----------------------------------	----

CAPÍTULO IV	57
--------------------	-----------

5.	RESULTADOS	59
5.1	ESTUDOS FUNCIONAIS	59
5.1.1	Avaliação ecocardiográfica	59
5.1.2	Avaliação hemodinâmica	63
5.1.3	Estudo de preparações de músculo liso da artéria pulmonar	64
5.2	ESTUDO MORFOMÉTRICO E HISTOLÓGICO	64
5.2.1	Avaliação morfométrica	64
5.2.2	Avaliação histológica	66
5.3	ESTUDO MOLECULAR	69
5.4	ANÁLISE DA SOBREVIDA	72

CAPÍTULO V	73
-------------------	-----------

6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÃO	83

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
-----------------------------------	-----------

ANEXO I	97
----------------	-----------

Lista de Abreviaturas

ADAM	Desintegrina e metaloproteinase A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementar
ALK-1	<i>Activin receptor like-kinase</i>
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Ang I	Angiopietina I
Ang II	Angiotensina II
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
BMPR2	Recetor da proteína morfométrica óssea tipo 2
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	Cateterismo cardíaco direito
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CRD	<i>Cystein-rich domain</i>
CTRL	Controlo
dNTP's	Nucleotídeos
DGV	Direção geral de veterinária
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOs	Óxido Nítrico sintase endotelial
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endotelina 1
ET_A	Recetor da endotelina-1 tipo A
ET_B	Recetor da endotelina-1 tipo B
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HC	Hipoxia crónica
HE	Hematoxilina Eosina
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HP	Hipertensão pulmonar
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IC	Insuficiência cardíaca
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
iNOs	Óxido nítrico sintase indutível
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	<i>Insulin like growth factor I</i>

IV	Interventricular
M2	Recetor muscarínico tipo 2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCT	Monocrotalina
MMP	Metaloproteinases da matriz
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nNOs	Óxido nítrico sintase neuronal
NOs	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
NRGs	Neuregulinas
NRG-1	Neuregulina 1
OMS	Organização mundial de saúde
PAPm	Pressão arterial pulmonar média
PDE5	Fosfodiesterase tipo 5
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3-K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PGI2	Prostaglandina I2
RT	Transcrição reversa
sGC	Ciclase do guanilato solúvel
TDI	Doppler tecidual
TKRs	Recetores tirosina cinase
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UA	Unidades arbitrárias
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Recetor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Péptido vaso intestinal
τ	Constante de relaxamento isovolumétrico

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença rara, considerada grave e progressiva, potencialmente fatal em poucos anos. Até aos anos 90, a única opção terapêutica eficaz disponível para esta patologia envolvia o transplante pulmonar ou cardiopulmonar. Contudo, nos últimos anos tem-se assistido ao aparecimento de novas opções terapêuticas que têm vindo a alterar o decurso desta doença¹.

1.1 DEFINIÇÃO

Até muito recentemente, o diagnóstico de hipertensão pulmonar (HP) era baseado numa elevação da pressão arterial pulmonar média (PAPm) para mais de 20 mm mercúrio (mmHg). Contudo, atualmente, a HP define-se, por consenso, pelo registo de uma PAPm igual ou superior a 25 mmHg em repouso, determinada por cateterismo cardíaco direito (CCD)²⁻⁴. Por sua vez, a HAP define-se pela presença de HP, sendo acompanhada por uma pressão de encravamento capilar pulmonar normal (≤ 15 mmHg) e por uma elevação da resistência vascular pulmonar, ≥ 240 dynes/s/cm ou a 3 mmHg/l/min (Unidades de Wood)⁵⁻⁶.

Na ausência de aplicação de tratamento aos doentes com HAP, a média de sobrevida após o diagnóstico situa-se nos 2,8 anos, verificando-se ao longo da progressão da doença um envolvimento do sistema cardiovascular, com sobrecarga progressiva sobre o ventrículo direito (VD) acabando por conduzir, inevitavelmente, à falência do VD e à morte². Por esta razão, a principal determinante do prognóstico da HAP é a integridade da função miocárdica do VD e não o grau de lesão pulmonar⁷⁻⁸.

1.2 CLASSIFICAÇÃO

A HP pode ocorrer na forma isolada ou associada a diferentes condições clínicas. Originalmente, a HP foi identificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como primária ou secundária conforme a identificação ou não de uma causa ou fator de risco da doença⁹. Esta classificação inicial sofreu uma reclassificação em 1998 no 2º Simpósio Mundial de HP (Evian)¹⁰. Neste, foi apresentada uma nova divisão das diferentes formas de HP em 5 grupos, tendo em

conta as suas semelhanças em termos patológicos, fisiopatológicos, expressão clínica e abordagem terapêutica¹¹.

Em 2003, no 3º Simpósio Mundial de HP (Veneza)¹² foram propostos novos ajustamentos na classificação de Evian. Nesta nova classificação a designação de HAP primária passou a ser substituída pela designação de HAP idiopática, sendo neste encontro também definida uma classificação fisiopatológica para os *shunts* sistémico-pulmonares congénitos¹¹.

Já em 2008, durante o 4º Simpósio Mundial de HP¹³, em Dana Point na Califórnia, decidiu-se manter as classificações Evian-Veneza, tendo sido feitos apenas alguns ajustes e correções de alguns tópicos considerando menos claros. Com a revisão de Dana Point uma das alterações mais relevantes ocorreu no grupo I com a substituição da designação de HAP familiar por HAP hereditária.

Atualmente, de acordo com a OMS, vigora a classificação de Dana Point 2008 (tabela I), estando as diferentes formas agrupadas por mecanismos fisiopatológicos, funcionando como guia de orientação para a aplicação de terapêutica¹¹.

Tabela I. Classificação da HP segundo a OMS, Dana Point, 2008

GRUPO I. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)	
1.1	Idiopática
1.2	Hereditária
1.2.1	BMPR2
1.2.2	ALK-1
1.2.3	Desconhecida
1.3	Induzida por droga ou toxina
1.4	Associada a:
1.4.1	Doenças do tecido conjuntivo
1.4.2	Infeção pelo vírus HIV
1.4.3	Hipertensão portal
1.4.4	Cardiopatía congénita
1.4.5	Shistosomíase
1.4.6	Anemia hemolítica crónica
1.5	Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
GRUPO II. Hipertensão pulmonar devida a doença cardíaca esquerda	
2.1	Disfunção sistólica do ventrículo esquerdo
2.2	Disfunção diastólica do ventrículo esquerdo
2.3	Doença valvular
GRUPO III. Hipertensão pulmonar devida a doença pulmonar e/ou Hipoxemia	
3.1	Doença pulmonar obstrutiva crónica
3.2	Doença intersticial pulmonar

3.3 Outras doenças pulmonares com padrão misto obstrutivo e restritivo 3.4 Patologia respiratória do sono 3.5 Hipoventilação alveolar 3.6 Exposição crónica a alta altitude 3.7 Anomalias do desenvolvimento
GRUPO IV. Hipertensão pulmonar tromboembólica crónica
GRUPO V. Hipertensão pulmonar por mecanismo multifatorial ou desconhecido
5.1 Doenças hematológicas: síndromes mieloproliferativas, esplenectomia 5.2 Doenças sistémicas, sarcoidose, histiocitose pulmonar de células de Langherans, linfangioleiomiomatose, neurofibro-matose, vasculites 5.3 Doenças metabólicas: doença do armazenamento do glicogénio, doença de Gaucher, doenças da tiroide 5.4 Outras: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crónica em hemodiálise compressão dos vasos pulmonares (adenopatia, tumor)

Legenda: BMPR: recetor da proteína morfogenética óssea tipo II; ALK-1: *activin receptor like-kinase*; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

Adaptado: Simonneau *et al*, 2009¹¹

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros dados epidemiológicos surgiram na década de 80 nos Estados Unidos da América (EUA) a partir de um estudo prospetivo realizado pelo *National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Health*. Este estudo apresentou os dados de 5 anos de avaliação de 187 doentes identificados com HAP “primária”. Neste estudo verificou-se que o tempo médio desde o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico situava-se nos 2 anos. A idade média de sobrevida sem aplicação de terapêutica encontrava-se nos 2,8 anos, sendo que ao fim de 5 anos apenas sobreviveram 34% dos doentes. Constatou-se também com este estudo que a HAP era predominante em jovens com idade média de 36 anos, que era cerca de 2 vezes mais frequente em mulheres do que em homens, apresentando uma incidência de cerca de 1-2 casos/1000000 habitantes/ano¹⁴.

Durante as duas últimas décadas foram registados vários avanços nesta patologia, nomeadamente a nível de técnicas de diagnóstico e opções terapêuticas, mudando ao longo do tempo alguns aspetos epidemiológicos da doença. Contudo, até á data o número de publicações sobre a epidemiologia da doença é escasso.

Em França o registo documentado de casos de HAP só começou em 2002, trazendo novos dados epidemiológicos importantes. Em 3 anos foram acompanhados 674 casos de HAP em indivíduos maiores de 18 anos, documentada hemodinamicamente. Como era de se esperar,

registou-se um aumento da sobrevida dos doentes para 88%, um aumento da prevalência para 15 casos/1000000 habitantes/ano e da incidência para 2,4 casos/1000000 habitantes/ano. No registo francês verificou-se que 56,5% dos casos de HAP estavam associados a outras condições patológicas, e os restantes 43,5% sem fatores associados e por isso considerados HAP idiopática. A idade média de diagnóstico aumentou para os 50 anos (± 15), abandonando-se a ideia de ser uma doença mais frequente em jovens³.

Dados como os provenientes do registo dos Estados Unidos da América, de França e de outros países como a Suíça¹⁵, Israel¹⁶, Escócia⁴ e China¹⁷, têm sido fundamentais para perceber a evolução epidemiológica da doença. Porém, estes dados não refletem a realidade mundial da HAP, devido às diferenças socioeconómicas, geográficas e de prevalência de doenças associadas. Os dados globais de HAP são impossíveis de obter devido à inexistência de registo destes doentes em muitos países.

Os dados publicados sobre a situação em Portugal também são escassos, mas segundo o registo português, em 2009, os dados de prevalência total da HAP situavam-se nos 25,6 caso/1000000 habitantes/ano, valor próximo do observado na Escócia (26 casos)⁴. Dos 25,6 casos 8 deles corresponderiam a HAP idiopática¹⁸.

Apesar de ser considerada uma doença rara, a prevalência da HAP aumenta em determinados grupos de risco, como nos doentes infetados com HIV. Devido à natureza não específica dos sintomas, a maioria dos doentes são diagnosticados numa fase avançada da doença, pelo que se julga que os valores de prevalência reais sejam ainda mais elevados do que os dados apresentados na literatura.

1.4 FATORES DE RISCO

Para melhor compreender a associação de cada fator de risco ao desenvolvimento da doença, em 1998, classificaram-se os fatores com base no seu grau de associação à HAP, em “definitivo”, “muito provável”, “provável” e “improvável”. Esta classificação baseou-se nos diversos estudos de associação de fatores de risco disponíveis, até à data. A tabela II apresenta alguns desses fatores de risco organizados segundo essa classificação¹¹.

Tabela II. Fatores de Risco da HAP (Classificação de 1998)

		Fatores de Risco		
		<i>Drogas e Toxinas</i>	<i>Fenótipos e condições médicas</i>	<i>Doenças</i>
Grau de Associação	Definitivo	Aminorex Fenfluramina Dexfenfluramina Óleo de colza	Sexo	HIV
	Muito provável	Anfetaminas, L-triptofano	-	Doenças no fígado/Hipertensão portal Doenças do tecido conjuntivo Shunts cardíacos sistémico-pulmonares congénitos Esplenectomia
	Provável	Cocaína Meta-anfetaminas Agentes quimioterápicos	Gravidez Hipertensão sistémica	Alterações na tiroide Condições hematológicas Doenças metabólicas
	Improvável	Antidepressivos Contracetivos orais Terapia com estrogénio Tabaco.	Obesidade	-

Adaptado: Galiè *et al*, 2004⁵

1.5 FISIOPATOLOGIA

A HAP é uma patologia das artérias pulmonares que pode ocorrer como consequência de outras condições clínicas, contudo na forma idiopática, a causa exata para o desenvolvimento da doença permanece desconhecida. Com os constantes avanços científicos ao nível da biologia molecular e vascular, alguns dos processos, que se pensa estarem envolvidos na etiologia da HAP, foram sendo clarificados.

A HAP caracteriza-se por ser uma condição complexa, multifatorial, que envolve diversas vias bioquímicas e diferentes tipos celulares. A disfunção endotelial, uma das alterações precoces que se pensa estar na génese da doença, é um dos principais processos observados nesta patologia. Esta disfunção, caracterizada pela proliferação de células endoteliais e musculares lisas, induz alterações estruturais do leito vascular pulmonar (remodelação vascular). Este aumento da resistência vascular ao nível do pulmão obriga a alterações no fluxo da circulação pulmonar, originando um estado de HAP¹⁹⁻²⁰.

Para além do envolvimento pulmonar, a HAP caracteriza-se por alterações a nível cardíaco (fig.1). Como consequência do aumento da resistência vascular pulmonar, ocorre um aumento da pós-carga do VD com consequente disfunção ventricular direita²¹.

Ao longo desta revisão de literatura serão apresentadas as alterações fisiológicas, celulares e mecanismos moleculares mais relevantes para o estudo.

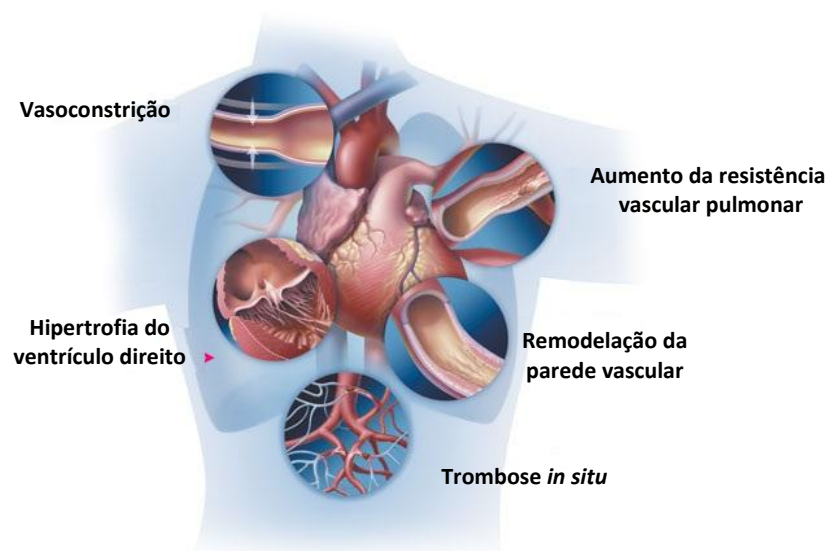


Fig. 1 Algumas das alterações fisiopatológicas mais frequentes observadas na HAP.

1.5.1 ALTERAÇÕES CELULARES

No processo de remodelação vascular estão implicadas células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos, podendo também ter um papel importante as células inflamatórias e as plaquetas. Existem evidências de que a HAP pode não estar apenas associada à proliferação celular, mas também a processos apoptóticos. Pensa-se que um equilíbrio entre ambos os processos (proliferativo e apoptótico) seja responsável pelo espessamento obstrutivo das artérias pulmonares na HAP²¹.

1.5.1.1 CÉLULAS MUSCULARES LISAS E FIBROBLASTOS

Uma das alterações comuns a todas as formas de HAP é a extensão periférica de células musculares lisas ao longo da parede das artérias pulmonares, dentro do ácino respiratório. O mecanismo exato, responsável pela muscularização da parte distal do sistema arterial pulmonar, ainda não é conhecido. Esta proliferação descontrolada de células musculares lisas acaba por

conduzir à hipertrofia da camada média e contribuir para o espessamento da camada íntima e adventícia da parede das artérias (fig.2). Estas mudanças na parede vascular resultam na redução do lúmen dos vasos, contribuindo para o aumento da pressão arterial²².

Para além da muscularização das artérias, outro achado muito comum, nas diferentes formas de HAP, é a formação de uma camada de miofibroblastos e matriz extracelular entre o endotélio e a lâmina elástica interna, denominada de neoíntima²². Em estudos com modelos animais, em particular o modelo da hipoxia, os fibroblastos aparentam ser das primeiras células a desenvolver capacidade proliferativa e de síntese de matriz proteica em resposta a um estímulo hipertensivo²³. O mecanismo envolvido na capacidade dos fibroblastos penetrar na camada média (podendo atingir a íntima) não está completamente clarificado, existem, no entanto fortes evidências do envolvimento de metaloproteínases da matriz (MMP2 e MMP9) neste processo. Estas proteínas, associadas a processos invasivos, são enzimas com atividade proteolítica, com particular habilidade para degradar proteínas da matriz extracelular. A MMP2 e MMP9 apresentam a capacidade peculiar de degradar o colagénio tipo IV que compõe a lâmina basal, sendo provavelmente responsáveis pelo processo invasivo²⁴.

Outra das características da HAP é o aumento constante da neovascularização nos *vasa vasorum*. Este processo afeta primariamente a adventícia mas pode prolongar-se até à camada média²⁵.

1.5.1.2 CÉLULAS ENDOTELIAIS

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo pulmonar e na resistência vascular, sendo que uma disfunção a este nível durante o desenvolvimento da HAP pode ter consequências nefastas tanto ao nível de coagulação, como do tónus vasomotor e, da remodelagem vascular. Não é conhecido o estímulo exato que desencadeia a desregulação das células endoteliais, no contexto de HAP, contudo pensa-se que este pode incluir processos tais como inflamação, suscetibilidade genética, drogas ou toxinas e hipoxia²⁶.

Na HAP é muito frequente observar-se a proliferação descontrolada de células endoteliais (fig.2) dando origem a lesões, particularmente em casos de HAP severa, como as lesões plexiformes (aglomerado de células)²⁶.

As células endoteliais, como resposta a um estímulo, podem sofrer, para além de alterações a nível proliferativo e apoptótico, alterações a nível funcional. O comprometimento da capacidade funcional destas células pode resultar num desequilíbrio entre a produção de vasoconstritores *versus* vasodilatadores, ativadores *versus* inibidores do crescimento e migração

de células musculares lisas, mediadores protrombóticos *versus* antitrombóticos e sinais pró-inflamatórios *versus* anti-inflamatórios²⁷⁻²⁸.

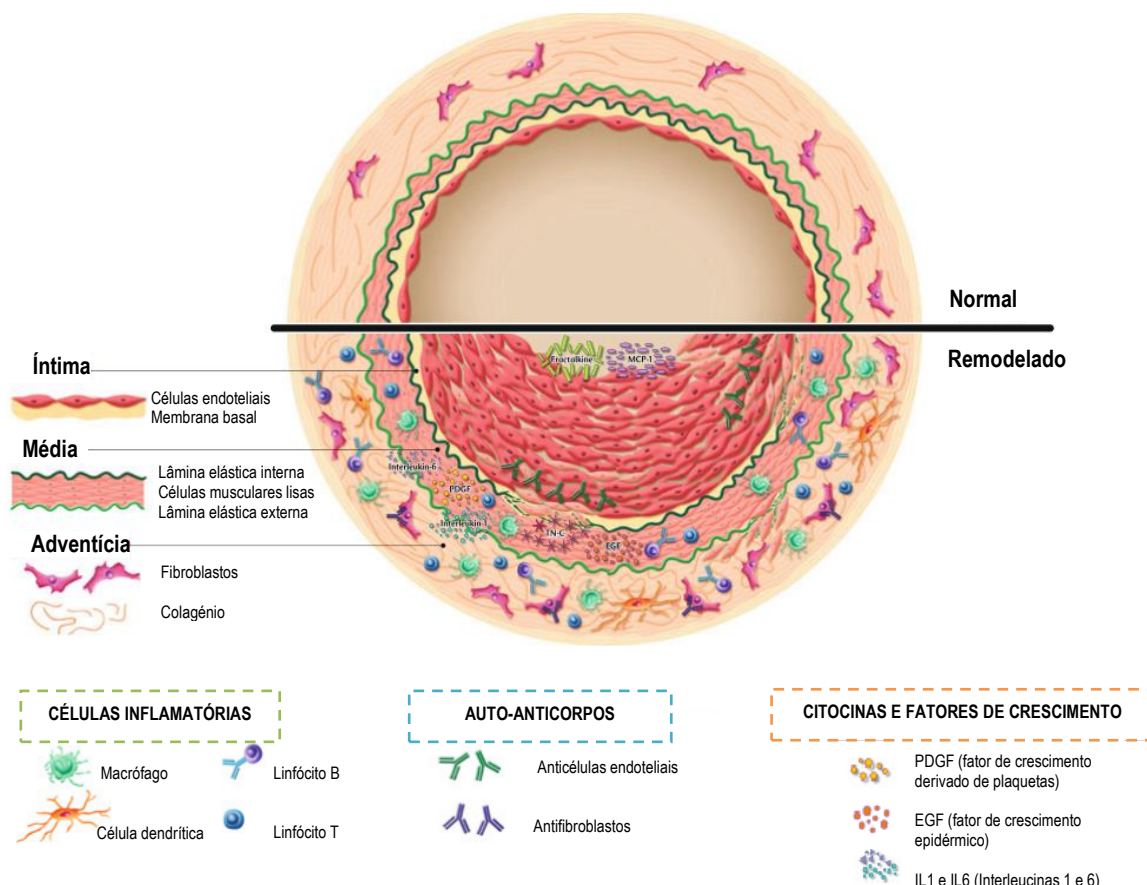


Fig. 2 Remodelagem vascular pulmonar característica da HAP.

Adaptado: Kherbeck *et al* 2011²⁸

1.5.1.3 CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Os mecanismos inflamatórios aparecem ativados (fig.2) em muitos tipos de HAP, especialmente no caso de HAP associada ao HIV e a doenças do tecido conjuntivo, sugerindo um papel significativo no desenvolvimento da patologia²⁹. Muitos dos doentes com HAP idiopática apresentam autoanticorpos em circulação (especialmente antinucleares) e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL1) e a interleucina 6 (IL6)³⁰. Dados histológicos também revelam a presença, a nível do tecido pulmonar, de infiltrados de células inflamatórias (linfócitos e macrófagos)³¹⁻³².

1.5.1.4 PLAQUETAS

Um dos achados muito comuns em doentes com HAP é a presença de lesões trombóticas e a disfunção plaquetária. A redução do fluxo de sangue na vasculatura pulmonar conduz a um risco aumentado de desenvolvimento de trombose *in situ*. Contudo, pensa-se que as alterações funcionais das células endoteliais apresentam um papel primordial no desenvolvimento de um fenótipo que favorece um estado pró-trombótico³³.

As plaquetas que se encontram habitualmente em circulação, numa forma inativa, podem ser ativadas na presença de uma lesão ou disfunção endotelial. Para além do seu envolvimento no processo de coagulação, uma vez ativadas, as plaquetas podem libertar importantes vasoconstritores como o tromboxano A₂, fatores ativadores de plaquetas (fig.2), serotonina, assim como importantes fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)³⁴. Estes fatores possivelmente vão contribuir para o agravamento da remodelação vascular.

Os níveis aumentados de D-dímeros, fibrina (fibrinopeptídeo A), fator de *von Willebrand*, e inibidor do ativador do plasminogénio (tipo I), no plasma dos doentes com HAP, são importantes evidências biológicas dos contínuos processos de coagulação intravascular e de alteração da atividade fibrinolítica do endotélio vascular, que afetam estes indivíduos³⁴.

1.5.2 MECANISMOS MOLECULARES

Dada a diversidade de mecanismos moleculares, que se pensa estarem associados ao desenvolvimento e à progressão da HAP, torna-se extremamente complexo o estudo molecular desta patologia. Na base de cada alteração a nível celular e fisiológico pode estar implicado um ou vários mecanismos moleculares o que dificulta ainda mais o estudo molecular. Vários grupos de investigadores têm-se dedicado ao estudo desta questão tão complexa, conseguindo desvendar muitos dos mecanismos subjacentes a esta doença, alguns dos quais são hoje importantes alvos terapêuticos. Não obstante, é de notar o constante aparecimento de novos mecanismos, moléculas, mutações e achados associados a esta patologia, o que demonstra que provavelmente haverá ainda muito a descobrir.

A vasoconstrição das artérias pulmonares, uma das alterações que está relacionada com o desenvolvimento de um estado hipertensivo, tem sido associada, não só à disfunção endotelial, mas também a uma disfunção ao nível dos canais de potássio (K⁺). Já a disfunção endotelial, leva a

uma redução na produção de vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e as prostaciclinas, e a um aumento da produção de vasoconstritores, como a endotelina (ET-1)²².

1.5.2.1 CANAIS DE POTÁSSIO

As alterações nos canais de potássio (K^+) são importantes mecanismos moleculares que contribuem para a vasoconstrição. Alguns canais de K^+ dependentes da voltagem aparecem desregulados tanto em doentes como em modelos animais de HAP. Uma inibição da atividade dos canais K^+ resulta numa despolarização da membrana celular, consequente aumento da abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes da voltagem e influxo de Ca^{2+} . Este aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos contribui inevitavelmente para a vasoconstrição³⁵.

1.5.2.2 PROSTACICLINAS

A prostaciclina (prostaglandina I₂ – PGI₂), produzida por células endoteliais da vasculatura pulmonar, consiste num importante vasodilatador, através da ativação de vias dependentes do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A PGI₂ tem capacidade de inibir a proliferação de células musculares lisas e diminuir a agregação plaquetária. No caso de doentes com HAP é evidente uma redução na síntese desta proteína, redução essa que não se sabe se é uma causa ou uma consequência do desenvolvimento de HAP³⁶⁻³⁷.

1.5.2.3 ÓXIDO NÍTRICO

O NO pode ser sintetizado ao nível do endotélio da vasculatura pulmonar em resposta a estímulos como acetilcolina, alteração dos níveis de Ca^{2+} intracelulares, ET-1, e stress mecânico³⁸. O NO é produzido durante a conversão da L-arginina a L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOs). Existem 3 isoformas diferentes de NOs: nNOs (forma neuronal), iNOs (forma indutível), eNOs (forma endotelial). A eNOs é a principal responsável pela produção de NO ao nível da circulação pulmonar³⁹⁻⁴¹. Depois de libertado pelas células endoteliais, o NO rapidamente vai atuar ao nível das células musculares lisas, onde se liga á ciclase do guanilato solúvel (sGC) e aumenta os níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Este aumento traduz-se numa redução nos níveis de Ca^{2+} intracelulares e do tónus muscular. Alguns estudos têm demonstrado que a ativação da via NO/cGMP inibe a proliferação de células musculares lisas e induz apoptose não só destas células como também de células endoteliais⁴²⁻⁴⁴. Por outro lado, a redução dos níveis de NO pode ter efeitos mitogénicos e facilitar a proliferação celular⁴⁵.

No contexto da HAP, a expressão NO é um assunto controverso, dada à discrepância de resultados existentes entre alguns grupos de investigadores. Se por um lado temos investigadores que descrevem o aumento da expressão de eNOs e iNOs em lesões plexiformes⁴⁶⁻⁴⁷, outros descrevem uma diminuição da expressão do eNOs no pulmão de doentes com HAP⁴⁸. Apesar de não ser ainda completamente compreensível o papel do NO na HAP, existem fortes evidências de que esta via de sinalização, quando ativada, pode atenuar os efeitos vasculares da HAP.

A destacar a importância da via do NO/cGMP, no contexto de HAP, temos o facto de esta ser um dos alvos da terapêutica existente. Foi possível verificar em estudos clínicos que a utilização de NO inalatório, tem efeitos vasodilatadores, reduzindo a resistência vascular pulmonar de forma rápida e reversível. No entanto a aplicação a longo prazo de NO inalatório pode ter efeitos nefastos para os doentes⁴⁹. Outra forma de potenciar os efeitos desta via de sinalização, é através da aplicação do sildenafil, um dos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da HAP. O sildenafil é um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). Esta pode ser encontrada em altas concentrações nos pulmões e é responsável pela metabolização do cGMP. A inibição da PDE5 aumenta os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico pela prevenção da degradação do cGMP, que promove o relaxamento da musculatura lisa vascular e assim, aumenta o fluxo sanguíneo. Nos modelos animais, o sildenafil tem produzido uma relativa redução seletiva da pressão da artéria pulmonar sem efeitos adversos em termos hemodinâmicos. A inibição da PDE5, pelo sildenafil, pode também aumentar a atividade antiagregante plaquetária do óxido nítrico e inibir a formação de trombos⁴⁹⁻⁵⁰.

1.5.2.4 ENDOTELINA-1

A ET-1, potente vasoconstritor, é produzida predominantemente ao nível de células endoteliais, no entanto, em condições específicas, esta pode ser produzida noutros tipos de células como no caso dos cardiomiócitos, macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas⁵¹⁻⁵². Alguns dos fatores responsáveis pela produção de ET-1 incluem a trombina, a insulina, a epinefrina, a angiotensina II, mediadores inflamatórios, hipoxia e stress mecânico⁵².

As ações biológicas da ET-1 são mediadas por dois tipos de recetores da endotelina (ET): recetor ET_A (expressa-se em células musculares lisas da vasculatura pulmonar e em cardiomiócitos) e ET_B (expressa-se tanto em células endoteliais como em musculares lisas)⁵³. Ambos os recetores apresentam uma resposta diferente face à ativação por parte da ET-1. O recetor ET_A, uma vez ativado, funciona como um importante mediador da vasoconstrição. Existem evidências de que o recetor ET_A promove o aumento da concentração de Ca²⁺ a nível intracelular,

através da ativação não seletiva dos canais de Ca^{2+} , em células musculares lisas⁵⁴. Para além do seu potente efeito vasoconstritor, estes recetores estão associados a processos proliferativos⁵⁵. Na vasculatura pulmonar normal, os recetores ET_B expressam-se predominantemente em células endoteliais⁵⁶. Uma vez ativados, promovem a vasodilatação através do aumento da produção de NO e prostaciclina, que vão atuar ao nível das células musculares lisas¹⁶. No entanto, existem evidências clínicas que sugerem que os recetores ET_B não são mediadores exclusivos de vasodilatação, mas que em determinadas condições patológicas (como na HAP), podem funcionar como mediadores de vasoconstrição⁵⁷.

Em doentes com HAP, têm vindo a ser observadas alterações significativas ao nível da atividade da ET-1, nomeadamente aumento dos níveis de ET-1 no plasma e aumento da sua expressão em células endoteliais no pulmão⁵⁸⁻⁵⁹. Uma das principais formas terapêuticas, existentes para a HAP, consiste na utilização de antagonistas dos recetores da ET-1, como o Bosentan. O Bosentan, consiste num fármaco oral, que tem a capacidade de bloquear de forma não seletiva ambos os recetores de ET-1, impedindo assim os efeitos patológicos da ET-1. Tem vindo a ser demonstrado, que a utilização deste tipo de terapêutica previne alterações como vasoconstrição, fibrose, proliferação de células musculares lisas, melhorando o estado de HAP⁶⁰.

1.5.3 ENVOLVIMENTO DA FUNÇÃO VENTRICULAR DIREITA

Durante o desenvolvimento de HAP, a elevação constante da resistência vascular pulmonar, conduz a um aumento da pós-carga no VD (fig.3), acompanhado por uma redução da fração de ejeção. Nestes doentes, é frequente observar-se a ocorrência de disfunção ventricular, como resultado da sobrecarga a que o VD está sujeito⁶¹.

Respostas como o aumento da pressão sistólica do VD e hipertrofia da parede ventricular, são numa primeira fase, reações fisiológicas adaptativas do VD, que têm como objetivo tentar compensar o deficiente bombeamento de sangue para a circulação pulmonar. Contudo, a persistência de uma sobrecarga acaba por resultar na disfunção mecânica e conduzir a um estado de insuficiência cardíaca (IC) do VD. A pressão crónica conduz a uma dilatação do VD e consequentemente a uma modificação da forma ventricular (de elipsoide a esférica). A progressiva dilatação leva a um aumento do stress na parede do VD, provocando regurgitação tricúspide devido a alterações na geometria ventricular⁶¹⁻⁶³. Estas alterações a nível funcional e geométrico acabam por vir também a comprometer, a longo prazo, a função do ventrículo esquerdo (VE)⁶¹. A maioria dos doentes com HAP desenvolve inevitavelmente IC, sendo atualmente a integridade da função miocárdica a principal determinante do prognóstico destes doentes, e não o grau de lesão pulmonar.

A IC traduz-se numa condição clínica caracterizada por redução na capacidade de enchimento ou ejeção ventricular^{61,64}. Durante a progressão para a IC, o nosso organismo tem a capacidade de ativar um complexo mecanismo adaptativo (resposta neuro-humoral) na tentativa de compensar o défice no débito cardíaco. A resposta neuro-humoral compreende 3 elementos fundamentais: a reação hemodinâmica, a resposta inflamatória e a resposta hipertrófica^{63,65}.

A reação hemodinâmica de defesa, que compreende a retenção hidrossalina, a vasoconstrição arteriolar e aumento da estimulação cardíaca, tem por objetivo manter a pressão sanguínea. Esta reação é mediada por cascatas de sinalização, controladas por mensageiros extracelulares que atuam não só ao nível do coração, mas também dos rins, vasos sanguíneos e músculos esqueléticos. Estes mediadores podem simultaneamente desempenhar respostas “contrarreguladoras” promovendo a redução da estimulação cardíaca, relaxamento dos vasos, promoção da diurese e inibição do crescimento celular⁶⁵⁻⁶⁶.

A resposta inflamatória traduz-se por um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente do fator de necrose tumoral α (TNF- α), da IL1, IL6 e do CD14 solúvel. Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias afetam negativamente a função ventricular esquerda, exercem um efeito inotrópico negativo, induzem alterações no metabolismo cardíaco e

promovem a remodelagem ventricular, resultando em hipertrofia dos cardiomiócitos, necrose, apoptose e alterações na matriz extracelular do miocárdio. As citocinas contribuem também para a caquexia, frequente em indivíduos que desenvolvem IC⁶⁵⁻⁶⁶.

Quanto à resposta hipertrófica do miocárdio, inicialmente adaptativa, representa uma tentativa de compensar a sobrecarga de pressão e/ou volume (uma consequência da IC) mas acaba por contribuir para a progressão e auto agravamento da IC. Nos cardiomiócitos, o stress biomecânico, como a hipertensão crónica e a sobrecarga de pressão, ativa múltiplos sinais que provocam hipertrofia e apoptose. É induzida a síntese e secreção de potentes fatores de crescimento, como a ET-1, o *insulin-like growth factor I* (IGF-1) e a angiotensina II (Ang-II)⁶⁵⁻⁶⁶.

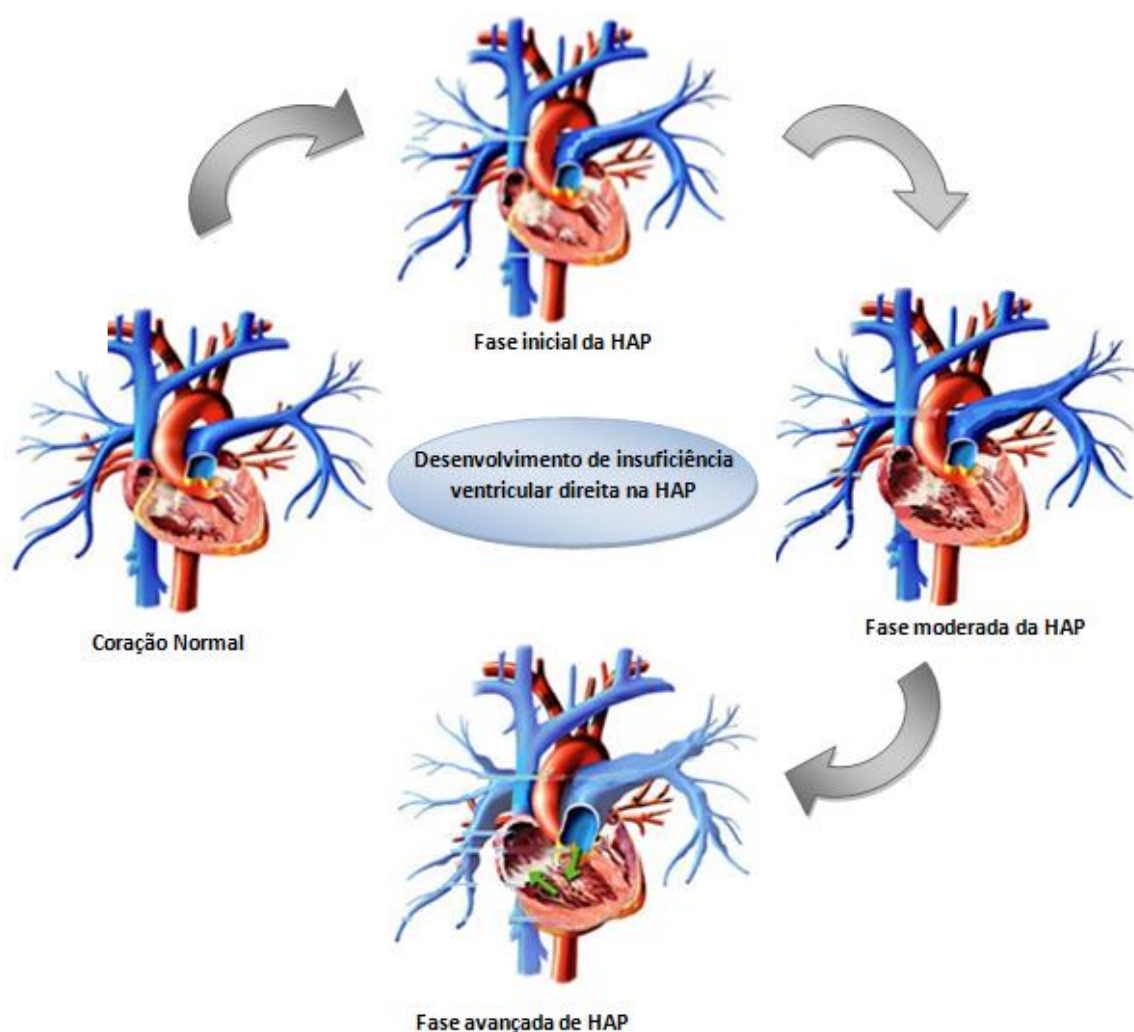


Fig. 3 Progressão para a insuficiência cardíaca direita.

Numa fase inicial ocorre uma ligeira dilatação na artéria pulmonar e na aurícula direita, acompanhada pelo início da hipertrofia ventricular direita. Numa fase moderada da doença ocorre a progressão da hipertrofia direita e consequente dilatação do VD. Na fase avançada da doença, verifica-se uma remodelagem acentuada da parede do VD, dilatação acentuada do VD, da aurícula direita e da artéria pulmonar, insuficiência tricúspide e da válvula pulmonar.

1.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS

Devido à inespecificidade da sintomatologia, o diagnóstico da HAP torna-se um processo complexo e que pode ser atrasado durante meses ou até anos, pelo que à data do diagnóstico, normalmente, já está presente um estado avançado da doença, de reversibilidade limitada⁶⁷⁻⁶⁸. O constante conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HAP tem conduzido a um grande progresso terapêutico. Atualmente a aplicação de terapêutica simples, ou na forma combinada, tem contribuído não só para aumentar a sobrevida dos doentes como também para melhorar a sua qualidade de vida (aliviando a sintomatologia)⁶⁹. A terapêutica aplicada pode passar por simples modificações no estilo de vida, como pela aplicação de agentes farmacológicos³¹. Os fármacos atualmente disponíveis têm como principais alvos, vias celulares específicas que se pensa estarem na génese da doença. Os principais agentes farmacológicos disponíveis incluem: bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , antagonistas dos recetores da ET-1, anticoagulantes, análogos das prostaciclina e inibidores da fosfodiésterase^{31,70-72}. Em casos extremos de HAP a terapêutica pode passar pelo transplante pulmonar simples ou combinado com transplante cardíaco⁷³. Apesar da vasta disponibilidade de opções terapêuticas, estas são extremamente dispendiosas, e conduzem apenas a melhorias ligeiras na sobrevida e capacidade funcional destes doentes. Assim, mantêm-se constante a necessidade de encontrar tratamentos mais eficazes, que consigam reverter o processo da doença e melhorar a função tanto pulmonar como cardíaca.

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HAP

Uma variedade de estímulos químicos, fisiológicos, moleculares e genéticos têm vindo a ser usados no sentido de criar modelos experimentais *in vivo* de HAP⁷⁴. Muito do que se sabe hoje acerca da fisiopatologia da HAP deve-se ao uso destes modelos experimentais em animais (tabela III).

Atualmente são conhecidos vários modelos que, apesar das suas limitações, têm contribuído de forma valiosa, não só para o conhecimento da fisiopatologia da doença como também para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas⁷⁵.

Um modelo experimental de HAP deve ser o mais realista possível, isto é, deve combinar uma série de alterações hemodinâmicas, biológicas e histopatológicas características de uma HAP em humanos, assim como deve ser uma representação do desenvolvimento e progressão da patologia⁷⁶. Um modelo de HAP ideal deveria ser capaz de reproduzir características patológicas e

hemodinâmicas de uma HAP idiopática como: excessiva remodelação da vasculatura pulmonar, caracterizada por hipertrofia da íntima e média; lesões plexiformes e proliferação da neoíntima; proliferação de células musculares e consequente obstrução das pequenas artérias pulmonares; vasoconstrição; trombose *in situ* em artérias de pequeno calibre; aumento da rigidez de artérias de grande e médio calibre; aumento significativo da resistência vascular pulmonar e elevação da pós-carga no VD. Para além disso, um modelo ideal deveria ser livre de efeitos secundários e tóxicos para o animal⁷⁶. Contudo, até à data, não existe um modelo animal de HAP ideal, sendo que cada grupo de investigação deve seleccionar, de entre os modelos disponíveis, aquele que melhor representa as alterações fisiopatológicas que pretende estudar.

De entre os modelos existentes, o modelo da monocrotalina (MCT) e da hipoxia crónica (HC) são os mais usados, não só para o estudo da fisiopatologia da HAP mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas⁷⁵.

Tabela III: Resumo de alguns dos modelos experimentais de HAP.

Modelo experimental	Espécies animais	Alterações observadas	Referências
Hipoxia Crónica (HC)	Rato, Ratinho, Vaca, Porco, Ovelha	Aumento da muscularização das arteríolas, espessamento da média e adventícia, doença pulmonar obstrutiva crónica, hipoventilação	77
Obstrução vascular	Cão, Porco, Rato, Ovelha	Tromboembolismo pulmonar crónico	78
Monocrotalina (MCT)	Rato, Cão	Proliferação de células musculares, espessamento da média, inflamação vascular, IC direita	79
Bleomicina	Ratinho, Rato e Coelho	Fibrose e aumento da muscularização,	80
<i>Streptococcus</i> grupo β	Porco, Ovelha	Vasoconstrição semelhante à da HP persistente do recém-nascido	81
Inibição do VEGFR2 + Hipoxia	Rato	Lesões plexiformes semelhantes à HP primária, proliferação aumentada de células endoteliais	82
Super expressão de Ang-I	Rato	Muscularização e oclusão vascular semelhantes à HP primária e secundária.	83
BMPR2 <i>Knock-out</i>	Ratinho	Aumento da muscularização	84
VIP <i>Knock-out</i>	Ratinho	HP moderada acompanhada por hipertrofia do VD e remodelação vascular	85
Super expressão de S100A4	Ratinho	Predisposição genética que resulta na ocorrência de lesões plexiformes associadas a HPA	86

Legenda: VEGFR2 – recetor 2 do fator de crescimento vascular endotelial; Ang-I – Angiotensina 1; VIP – péptido vaso intestinal; S100A4 – gene associado a metástases.

Adaptado: Firth *et al*, 2010⁷⁶.

2. NEUREGULINAS

As Neuregulinas (NRGs) compreendem uma vasta família de glicoproteínas de sinalização, similares ao fator de crescimento epidérmico (EGF - *Epidermal Growth Factor*). As NRGs estão envolvidas em várias funções, como na comunicação intercelular, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, em vários tipos de tecidos, quer durante o desenvolvimento embrionário, quer no indivíduo adulto. Estas são primariamente expressas no sistema nervoso, coração, glândulas mamárias, intestino e rins⁸⁷. As NRGs transmitem sinais às células alvo através da interação com recetores do tipo tirosina cinase, conhecidos como recetores ErbB (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*)⁸⁸.

As NRGs foram descritas pela primeira vez entre 1992 e 1993 por três grupos distintos: como ativadores do ErbB2⁸⁹; como estimuladores da proliferação de células Schwann⁹⁰; e como indutores dos recetores de acetilcolina nas junções neuromusculares⁹¹. A proteína isolada por estes três grupos de investigadores foi mais tarde identificada como sendo a Neuregulina tipo 1 (NRG-1).

Até à data, são conhecidos quatro genes diferentes codificadores de NRGs (*NRG-1*, *NRG-2*, *NRG-3*, *NRG-4*). Cada gene tem a capacidade de codificar uma proteína específica, e dentro de cada tipo de proteína ainda podemos encontrar diferentes isoformas, as quais diferem entre si principalmente na afinidade para os recetores ErbB⁸⁷.

Atualmente, ainda muito pouco se sabe acerca das funções das NRG-2, NRG-3 e NRG-4, ao contrário do que acontece com a NRG-1. Esta tem sido alvo de inúmeros estudos, em particular ao nível do sistema nervoso e cardiovascular. Sabe-se que a NRG-1 é um potente fator de crescimento envolvido em funções celulares específicas como, proliferação, diferenciação, e sobrevivência⁹².

2.1 NEUREGULINA 1

A NRG-1 é codificada por um gene de 1400 kb, localizado no cromossoma 8p12, com vários promotores e capacidade de realizar *splicing* alternativo, que dá origem a diferentes isoformas. Até à data são conhecidas pelo menos 15 isoformas diferentes de NRG-1⁸⁷.

A NRG-1 é caracterizada pela presença de um domínio extracelular semelhante ao EGF. Este domínio consiste na presença de seis resíduos de cisteína espacialmente conservados, que

sozinhos são suficientes para ativar os recetores ErbB⁹³. Através de *splicing* alternativo, o gene da NRG-1 pode formar diferentes variantes do domínio EGF (α e β), que diferem quanto à sua afinidade para um recetor. A NRG-1 β é cerca de 100 vezes mais ativa do que a α . Os diferentes promotores têm a capacidade de produzir os três principais tipos de NRG-1 (fig.4): tipo I, tipo II e tipo III. Estes três tipos de NRG-1 diferem quanto à composição do domínio extracelular (especificamente na sequência N-terminal)⁹⁴⁻⁹⁵. A NRG-1 tipo I e tipo II possuem um domínio tipo Ig (Imunoglobulina), sendo por vezes designadas por “Ig-NRGs”. Estas são proteínas transmembranares que atravessam a membrana citoplasmática em apenas um local, ao contrário do que acontece com a NRG-1 tipo III que atravessa a membrana em dois pontos diferentes. As NRG-1 tipo III contêm um domínio rico em cisteína pelo que também podem ser identificadas como “CRD-NRG” (*Cysteine-rich domain*). As NRG-1 do tipo I são as isoformas predominantes no coração, não sendo, no entanto, exclusivas⁹⁵.

A maioria das isoformas da NRG-1 pode ocorrer como ligandos de membrana ou como fatores de secreção, que podem atuar por via paracrina, autocrina, ou juxtacrina⁹⁵⁻⁹⁶. A clivagem proteolítica da NRG-1 pelos membros da família “desintegrina e metaloproteinase A” (ADAM), nomeadamente pela ADAM17 e ADAM19, resulta na libertação de fragmentos bioativos (no caso da NRG-1 tipo I e II) ou na formação de um fragmento N-terminal transmembranar (no caso da NRG-1 tipo III). Esta clivagem proteolítica é necessária para a libertação do domínio extracelular, de forma que este possa ativar os recetores ErbB e dar início à ativação das vias de sinalização do sistema NRG-1/ErbB^{95,97}.

As ações biológicas da NRG-1 são mediadas pelos recetores ErbB2, ErbB3 ou ErbB4. A NRG-1 tem a capacidade de se ligar ao recetor e induzir dimerização, levando à fosforilação deste, que dependendo da formação de homo ou heterodímeros, promovem a ativação de diferentes vias de transdução de sinal⁹⁸.

Apesar de a NRG-1 ter sido originalmente identificada como um ligando do ErbB2, hoje sabe-se que esta não tem capacidade de se ligar a este recetor. Este só é ativado como resultado do processo de heterodimerização com o ErbB3 ou ErbB4⁹⁹. Os recetores da NRG-1 funcionais, *in vivo*, podem ser heterodímeros de ErbB2 associado ao ErbB3 ou ao ErbB4 ou homodímeros de ErbB4 (fig.5)¹⁰⁰.

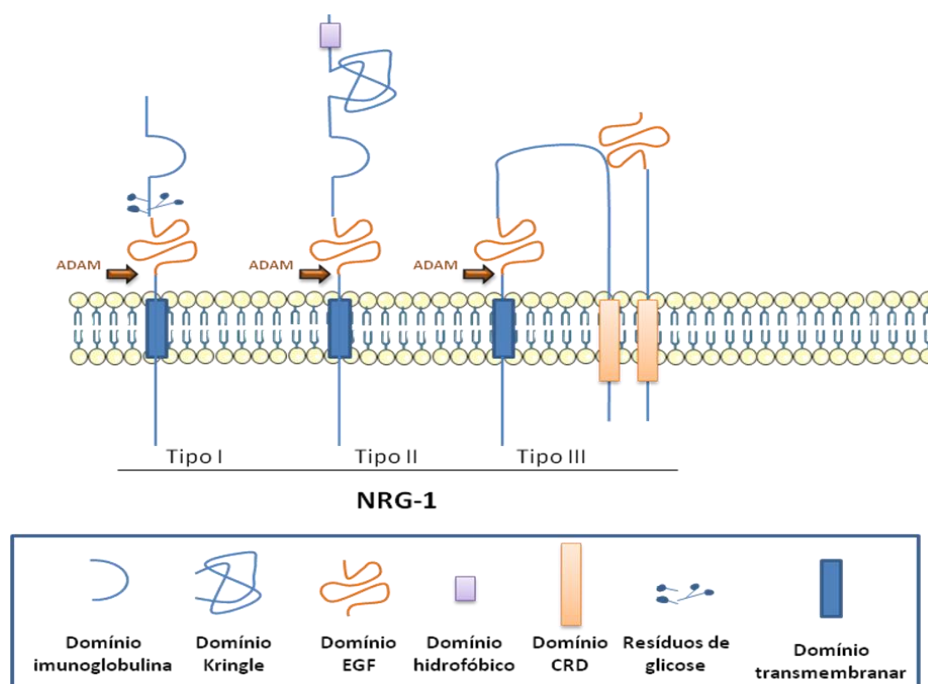


Fig. 4 Representação esquemática dos diferentes tipos de NRG-1, diferentes domínios e clivagem proteolítica.

2.2 RECETORES ERBB

Os recetores ErbB pertencem à subclasse I da superfamília dos recetores tirosina cinase (TKRs). Estes têm a capacidade de mediar vias de sinalização associadas à proliferação, diferenciação, migração e reorganização estrutural das células¹⁰¹. Para além do seu importante papel em diversos processos fisiológicos, estas proteínas estão fortemente associadas a inúmeros tipos de tumores. Em diversos tipos de cancro, estes recetores aparecem hiperativos ou desregulados¹⁰². A família das proteínas ErbB, também conhecida por HER (*human epidermal growth factor receptor*) inclui quatro recetores tirosina cinase: ErbB1, ErbB2, ErbB3 e ErbB4. Estes são moléculas de grandes dimensões (170-185kDa) que apresentam uma arquitetura molecular muito similar entre eles. Estruturalmente possuem um domínio extracelular (com duas regiões ricas em cisteína), um domínio transmembranar e um domínio intracelular (com uma região catalítica tirosina cinase e um domínio C-terminal, com múltiplos locais de autofosforilação)^{99,103}. O domínio extracelular pode ser dividido em 4 regiões (I-IV). As regiões I e III fazem parte da ligação com o ligando e as II e IV funcionam como plataforma para a ligação entre recetores ativados¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

Apesar da abundância de ligandos, não é conhecido nenhum ligando de alta afinidade para o ErbB2, permanecendo a sua função incerta. Contudo, a descoberta da

existência de heterodímeros com ErbB2, veio sugerir que o ErbB2 funciona como um corretor dos restantes membros da família ErbB (fig.5), podendo desempenhar um papel crucial na potenciação do sinal¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Ao contrário do que se passa com o ErbB2, a NRG-1 apresenta alta afinidade para os recetores ErbB3 e ErbB4. Em condições fisiológicas, a ativação dos ErbB é controlada espacial e temporalmente pela expressão dos seus ligandos^{106,108}.

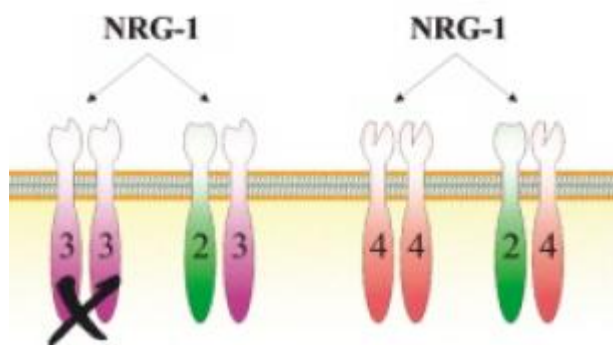


Fig. 5 Recetores funcionais da NRG-1

Os homodímeros de ErbB3 não têm capacidade de ativar vias de sinalização intracelular. A NRG-1 liga-se com alta afinidade aos recetores ErbB3 e ErbB4, mas não tem capacidade de se ligar ao ErbB2. Não é conhecido nenhum ligando para o ErbB2, logo este é considerado um corretor. *In vivo*, os recetores funcionais da NRG-1 podem ser homodímeros de ErbB4 ou heterodímeros de ErbB3-ErbB2 ou ErbB4-ErbB2.

Adaptado: Olayioye *et al*, 2000¹⁰⁸.

2.2.1 ATIVAÇÃO DOS RECETORES ERBB

A ligação das NRGs e a formação de dímeros são passos fundamentais para a ativação dos recetores ErbB e início das respetivas vias de sinalização.

Ao estudar a estrutura dos recetores ErbB, dois grupos de investigação distintos, revelaram que o recetor ErbB2 é o único que possui uma configuração do domínio extracelular fixa (conformação pré-ativada)^{100,109}. Por outro lado, os recetores ErbB3 e ErbB4 possuem uma configuração inativa, necessitando de sofrer uma ativação inicial para adquirirem uma configuração, semelhante à do ErbB2 e poderem formar homo ou heterodímeros (fig.6)¹¹⁰.

Na sua forma inativa, os recetores ErbB3 e ErbB4, adotam uma configuração onde as regiões II e IV do domínio extracelular permanecem em interação. Esta interação impede a formação de dímeros com outros recetores^{109,111}. A exposição destas regiões é dependente da ligação de um ligando (NRGs) às regiões I e III, que se encontram expostas. Esta ligação induz uma desestabilização da estrutura do domínio extracelular, obrigando a uma reconfiguração deste e à exposição das regiões II e IV (fig.6). Forma-se assim uma estrutura semelhante à do ErbB2, em

que as regiões II e IV ficam livres para se ligar a outros recetores e o ligando fica retido entre as regiões I e III¹¹²⁻¹¹³.

A estrutura fixa pré-ativada do ErbB2, permite-nos compreender o facto de não existir um ligando de alta afinidade para este recetor. Como este recetor possui as regiões I e III (de ligação com as NRGs) próximas, com uma configuração muito fechada, evita que se constituam ligações de alta afinidade com ligandos. Por outro lado, este recetor é um excelente par de dimerização, uma vez que não precisa de sofrer um processo de ativação inicial, pois mantém sempre as regiões II e IV expostas, e prontas a formar pontes de ligação com outros recetores na sua proximidade^{100,114}.

O processo de dimerização permite a ativação da região tirosina cinase no domínio intracelular, por auto- ou transfosforilação, resultando na fosforilação do domínio C-terminal¹¹⁰.

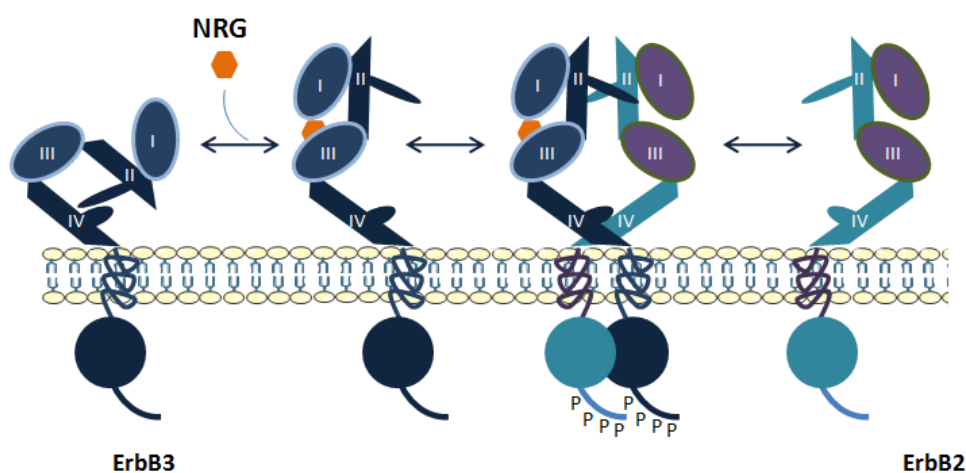


Fig. 6 Ativação dos recetores ErbB

2.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA NRG-1/ERBB

Após a ativação dos recetores ErbB pela NRG-1, os resíduos fosforilados do domínio C-terminal iniciam o recrutamento de outras moléculas de sinalização, quer diretamente (PI3K, STAT, Src) quer via moléculas adaptadoras (Shc, Grb2, Gab), o que resulta na ativação de múltiplas vias de sinalização, normalmente interligadas umas com as outras¹⁰⁸. Algumas das vias de sinalização mais importantes (fig.7), sob o ponto de vista funcional, que podem ser ativadas pelo sistema NRG-1/ErbB são a via das *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e do *phosphatidylinositide-3-kinase* (PI3-K)¹¹⁴.

A via da MAPK é das maiores vias de sinalização, que regulam processos celulares como a proliferação, diferenciação, migração e apoptose. A fosforilação do ErbB2, por si só, parece ser suficiente para ativar esta via⁸⁷. No entanto, homodímeros de ErbB4 ou heterodímeros de ErbB2-ErbB4 também desempenham um importante papel na ativação desta via, como resposta á ativação por parte da NRG-1¹¹⁵.

A via do PI3-K parece estar envolvida na regulação do metabolismo, crescimento celular, proliferação e proteção contra a apoptose. Dentro da família dos recetores ErbB, o ErbB3 e o ErbB4 parecem ser os principais ativadores desta via. Apesar de ainda não ser completamente compreendida, a via do PI3-K parece estar envolvida em processos induzidos pela NRG-1, associados a alteração na expressão do gene bcl-2, ao aumento da captação de glicose, á ativação da eNOs e á alteração na respiração mitocondrial^{87,116-117}.

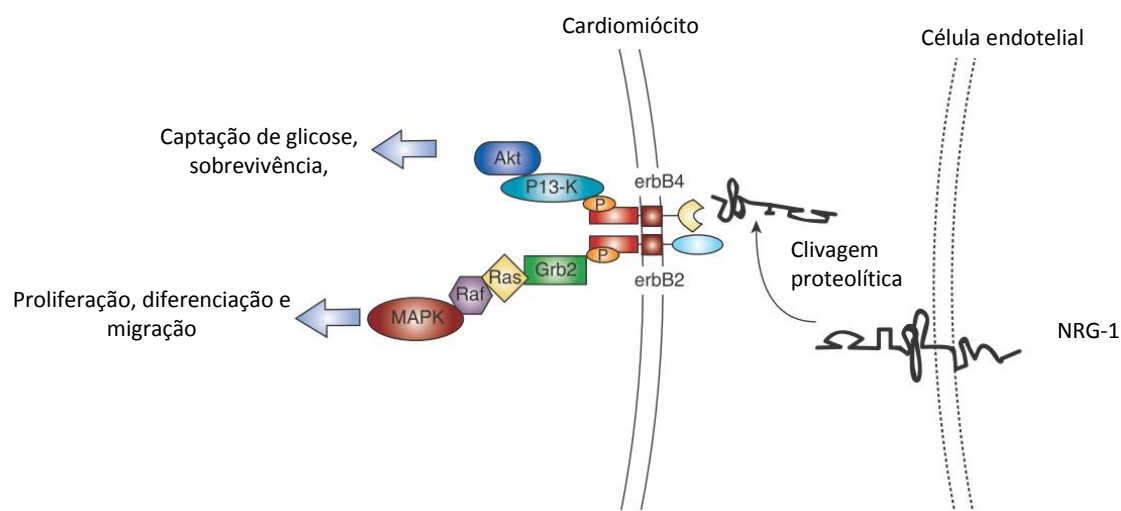


Fig. 7 Principais vias de sinalização do sistema NRG-1/ErbB
Adaptado: Peng *et al* 2005¹¹⁷

2.4 PAPEL DA NRG-1 NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

As primeiras evidências científicas, da importância do sistema NRG-1/ErbB e do seu papel a nível cardíaco, surgiram de estudos clínicos em que era usado um anticorpo monoclonal dirigido contra o ErbB2, designado por trastuzumab (Herceptin®), em doentes com cancro da mama associado a uma sobre-expressão deste recetor. Verificou-se que os doentes tratados com trastuzumab apresentavam disfunção sistólica, comparativamente com o grupo de não tratados, disfunção esta que era acentuada com o uso de antraciclinas associadas ao trastuzumab. Apesar

da intensa investigação nesta área, o conhecimento do mecanismo exato pelo qual o trastuzumab contribui para o desenvolvimento de disfunção ventricular permanece incompleto¹¹⁸⁻¹¹⁹. Contudo, este achado clínico ocasional, acabou por dar origem a diversos estudos sobre o papel do sistema da NRG-1/ErbB na função cardiovascular.

2.4.1 NRG-1 NO DESENVOLVIMENTO CARDÍACO

As evidências do papel fundamental da NRG-1 e dos seus recetores no desenvolvimento do coração, surgiram de estudos com ratinhos *knock-out* para os genes da NRG-1, ErbB2 e ou ErbB4. Estes morriam no útero (entre os dias 10,5 e 11,5) por falhas no desenvolvimento do coração⁸⁷. Mais tarde, vários estudos vieram demonstrar que o sistema NRG-1/ErbB desempenhava um papel muito importante no desenvolvimento estrutural e funcional do coração, como por exemplo: na trabeculação¹²⁰ (proliferação de miócitos, resultando no espessamento da parede muscular dos ventrículos), angiogénese¹²¹, formação das válvulas cardíacas¹²², e na prevenção de cardiomiopatia dilatada¹²³⁻¹²⁴. Durante o desenvolvimento normal do embrião, entre os dias 10 e 11, a NRG-1 pode ser encontrada no endotélio do endocárdio e os recetores ErbB2 e ErbB4 em cardiomiócitos. O recetor ErbB3 não é encontrado nem no endotélio nem em cardiomiócitos, sendo apenas detetado nas células mesenquimais do coxim endocárdico (estrutura que separa o ventrículo da aurícula embrionária)^{120,125-126}. Embora os estudos em ratinhos com défice em ErbB3 não tenham revelado um efeito letal, a ausência deste recetor parece permitir o desenvolvimento cardíaco, mas acompanhado por anormalidades sobretudo ao nível das válvulas cardíacas^{122,127}.

2.4.2 NRG-1 NO CORAÇÃO ADULTO

No coração adulto, a NRG-1 expressa-se nas células endoteliais do endocárdio e da microvasculatura miocárdica, sendo encontradas pelo menos 3 isoformas diferentes de NRG-1 α e 8 de NRG-1 β ^{87,125}. Zhao *et al*¹²⁸, em 1998, demonstraram que o ErbB2 e o ErbB4 eram os únicos recetores da NRG-1 encontrados nos cardiomiócitos. Desde então, não foram publicados estudos sobre o ErbB3 no coração. Contudo, em 2011, Campresió *et al*¹²⁶ reportaram a existência de ErbB3 na membrana dos cardiomiócitos, embora com uma expressão muito inferior à dos recetores ErbB2 e ErbB4.

2.4.2.1 EFEITOS A NÍVEL DOS CARDIOMIÓCITOS

Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que o uso de NRG-1 recombinante tem um efeito muito importante ao nível dos cardiomiócitos, nomeadamente na regulação da sobrevivência, proliferação, hipertrofia¹²⁸, organização miofibrilar¹²⁹ e na regulação do contacto entre células¹³⁰. Ainda em estudos *in vitro*, é possível verificar as propriedades cardioprotectoras da NRG-1, esta protege os cardiomiócitos, em cultura celular, contra a apoptose induzida por stress oxidativo ou antraciclinas, essencialmente através da ativação da via PI3-K¹²⁸. Pensa-se que os recetores que participam nestas funções, ao nível dos cardiomiócitos, sejam essencialmente heterodímeros de ErbB2-ErbB4^{92,119,131}.

Por outro lado, os resultados de estudos *in vivo* têm indicado que a NRG-1 não é necessária para a sobrevivência e divisão celular em condições fisiológicas normais. No entanto, certos estímulos como por exemplo, infeções víricas, deficiências nutricionais e stress oxidativo, podem ativar o sistema NRG-1/ErbB, promovendo a proteção dos cardiomiócitos contra a apoptose¹³².

2.4.2.2 INTERAÇÃO COM MEDIADORES NEURO-HUMORAIS

Existem evidências de que o sistema NRG-1/ErbB interage com o sistema neuro-humoral, nomeadamente o facto de a NRG-1 inibir a resposta inotrópica cardíaca, tendo efeitos antiadrenérgicos (fig.8). Lemmens *et al* demonstraram que a NRG-1 diminui a resposta inotrópica à estimulação adrenérgica, usando músculo papilar isolado do VD de coelho, reproduzindo assim os efeitos antiadrenérgicos dos recetores muscarínicos¹³³.

É de realçar o facto dos efeitos antiadrenérgicos do sistema NRG-1/ErbB e dos efeitos da sinalização muscarínica antiadrenérgica funcionarem em mútua cooperação. A sinalização NRG-1/ErbB antiadrenérgica desaparece quando o recetor colinérgico muscarínico está bloqueado, e a sinalização colinérgica muscarínica está diminuída quando a NRG-1 está ausente. Dentro desta cooperação, entre as vias ativadas pelos recetores ErbB e os recetores muscarínicos, a regulação da síntese e libertação de NRG-1 desempenha um papel preponderante. A síntese e a libertação desta proteína, em parte, são controladas pela atividade dos sistemas adrenérgicos e renina-angiotensina. A NRG-1 pode ser produzida por células do endotélio cardíaco, em resposta aos níveis de angiotensina II e epinefrina na circulação sanguínea. A partir de resultados obtidos em estudos *in vitro* é possível especular-se que através desta cooperação com o sistema colinérgico, a NRG-1 pode diminuir o débito cardíaco, e consequentemente a pressão sanguínea. Os mecanismos moleculares que estão envolvidos na interação entre estas duas vias de sinalização

não são conhecidos. No entanto, Lemmens *et al* descreveram que o efeito antiadrenérgico da NRG-1 é mediado pelo NO sintetizado a partir da eNOs nos cardiomiócitos^{92,125,131-133}.

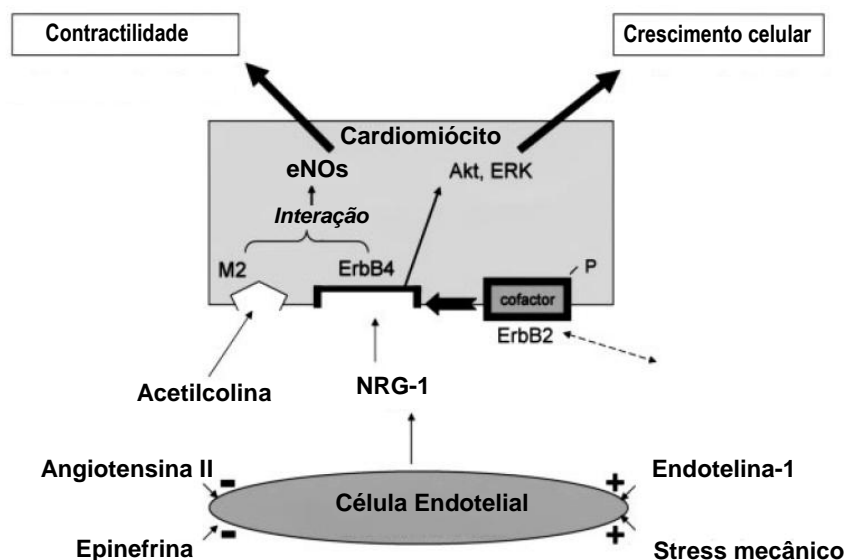


Fig. 8 Biologia do sistema NRG-1/ErbB no coração (interação neuro-humoral)

A NRG-1 é sintetizada em células endoteliais cardíacas, sendo esta síntese suprimida pela angiotensina II e epinefrina, e estimulada pela endotelina-1 e stress mecânico. A NRG-1 liga-se aos recetores ErbB nos cardiomiócitos, ativando, desta forma, vias de crescimento e proteção celular. Paralelamente, as atividades de cooperação com o recetor muscarínico 2 (M2), e a ativação da eNOS, podem afetar a contractilidade miocárdica e resposta adrenérgica.

Adaptado: Lemmens *et al* 2007⁹²

2.4.2.3 NRG-1 E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

O efeito cardiotóxico do trastuzumab foi o primeiro indicador do envolvimento do sistema NRG-1/ErbB na fisiopatologia da IC. Enquanto alguns estudos demonstram que o sistema NRG-1/ErbB está ativado na IC ventricular esquerda, outros têm demonstrado que a atividade deste sistema é reduzida¹³⁴⁻¹³⁷. Esta incongruência de resultados, segundo Lemmens *et al* pode ser explicada pelo facto de o sistema NRG-1/ErbB desenvolver um comportamento bifásico ao longo do decurso da IC (fig.9)⁹². Pensa-se que numa fase inicial este sistema é ativado como uma resposta adaptativa no ventrículo esquerdo, contudo, no prolongamento da IC este sistema torna-se desregulado, verificando-se uma drástica inibição da sua atividade. Ainda não é compreensível se a inibição deste sistema é a causa ou o resultado da falência ventricular, ou representa apenas uma resposta adaptativa. Contudo, é interessante realçar que em estudos *in vitro*, com células

endoteliais cardíacas, o stress mecânico aumenta a síntese e libertação de NRG-1. Como foi anteriormente referido, a angiotensina II e epinefrina têm um efeito oposto, logo é possível especular que numa primeira fase o stress a que a parede ventricular está sujeita induz ativação do sistema NRG-1/ErbB, mas com a progressão da doença e a ativação do sistema neuro-humoral esta atividade seja inibida^{92,137}.

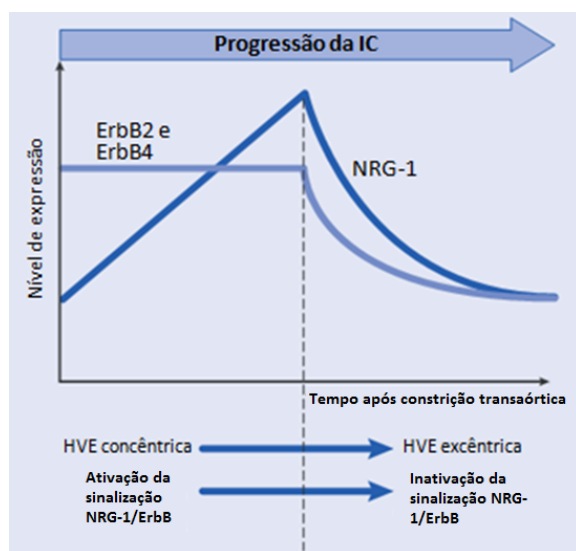


Fig. 9 Comportamento do sistema NRG-1/ErbB durante o desenvolvimento de IC esquerda.

A constrição da aorta aumenta os níveis de NRG-1. Esta ativação inicial da sinalização NRG-1/ErbB, provavelmente devido a stress mecânico, coincide com o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) concêntrica. A subsequente inibição desta via coincide com o desenvolvimento de hipertrofia excêntrica e IC, e caracteriza-se por uma diminuição da expressão de NRG-1, ErbB2 e ErbB4. Este decréscimo pode estar relacionado com níveis aumentados de angiotensina II e epinefrina.

Adaptado: Lemmens *et al*, 2008¹²⁵

Tendo em conta o seu papel a nível dos cardiomiócitos, a sua interação com o sistema neuro-humoral e a sua implicação na fisiopatologia da IC, vários investigadores direccionaram o seu estudo para os possíveis efeitos terapêuticos da administração de NRG-1 recombinante, em doentes com IC esquerda. Liu *et al*¹³⁸ estudou os efeitos do tratamento com NRG-1 em 4 modelos animais diferentes de IC ventricular esquerda grave (cardiomiopatia induzida pela doxorubicina, isquémica, dilatada e vírica), verificando, a curto prazo, uma melhoria da função cardíaca, atenuando as alterações patológicas e prolongando a sobrevivência dos animais. Gao *et al*¹³⁹, em ensaios clínicos usando 44 doentes com IC crónica, demonstraram que uma administração de NRG-1 recombinante humana, durante 10 dias consecutivos, resulta numa melhoria da performance cardíaca, aumentando a fração de ejeção e diminuindo os volumes telediastólico e telessistólico. Muito recentemente, esta melhoria da função cardíaca foi corroborada por Jabbour *et al*¹⁴⁰, que ao estudar 15 doentes com IC crónica estável, verificaram que a administração intravenosa de NRG-1 recombinante, durante 11 dias, melhorou a função cardíaca, para além de ter sido bem tolerada pelos doentes.

2.5 NRG-1 NA HAP E NO DESENVOLVIMENTO DE IC VENTRICULAR DIREITA

Apesar da existência de inúmeros estudos sobre o papel da NRG-1 na fisiopatologia da IC ventricular esquerda, até à data, não existem estudos relativos à implicação desta proteína na progressão para a IC direita. A IC direita é uma das consequências mais importantes do desenvolvimento de HAP, sendo a integridade miocárdica uma das principais determinantes do prognóstico desta patologia e um dos principais alvos terapêuticos. Nesse sentido, e tendo em conta todos os seus efeitos benéficos a nível do ventrículo esquerdo, tornou-se pertinente o estudo do envolvimento do sistema NRG-1/ErbB no contexto de HAP e progressão para IC ventricular direita.

Para além da possibilidade de implicação do sistema NRG-1/ErbB no desenvolvimento de IC direita, vários achados clínicos, que envolvem este sistema, em diversas áreas, acabaram por suscitar ainda mais o nosso interesse quanto ao papel deste sistema no contexto de HAP.

Inúmeros estudos têm revelado que a NRG-1 estimula a angiogénese e que os recetores ErbB são essenciais para o recrutamento de células musculares lisas vasculares, regulado pela angiopoietina e efetuado por células endoteliais durante este processo^{121,141-142}.

Para além dos seus efeitos a nível da angiogénese, estudos como os de Panutsopulos *et al* e Sigala *et al* demonstraram que a expressão de NRG-1 está aumentada em lesões ateroscleróticas humanas¹⁴³⁻¹⁴⁴. Mais tarde, Xu *et al*¹³², ao estudarem o efeito da NRG-1 na aterosclerose (doença inflamatória crónica, que afeta a parede dos vasos arteriais), concluíram que o aumento de NRG-1, descrito anteriormente, poderia ser o resultado de uma resposta benéfica do organismo, atribuindo assim à NRG-1 efeitos antiateroscleróticos.

Outro efeito, descrito a nível vascular, é o papel da NRG-1 no desenvolvimento da neoíntima, uma das lesões muito característica na HAP. Clement *et al* descreveram que a NRG-1 atenua significativamente a formação de lesão vascular após uma lesão e impede a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares, sugerindo que, a NRG-1 tem um efeito inibidor na formação de neoíntima após lesão vascular e, como tal, poderá ser útil na prevenção e no tratamento de doenças vasculares¹⁴⁵. Pensa-se que o aumento da NRG-1, após uma lesão vascular, possa ser um mecanismo de resposta protetora, para inibir a proliferação local de células musculares lisas. Para além dos efeitos diretos sobre as células musculares lisas, a NRG-1 parece afetar a resposta pró-inflamatória que agrava os processos envolvidos na formação da neoíntima. Sabe-se ainda, que esta molécula pode evitar a produção de matriz extracelular, necessária para facilitar a expansão da lesão da neoíntima¹⁴⁵.

Outro estudo pertinente, foi o de Kalinowski *et al*, publicado recentemente, que revela que citocinas inflamatórias como o IL6 promovem o aumento da libertação de NRG-1, através do aumento dos níveis de ADAM17. A IL6, como referido anteriormente, é uma das citocinas que está aumentada em doentes com HAP¹⁴⁶.

A nível pulmonar, embora não seja ainda conhecida a importância do sistema da NRG-1 na fisiologia da vasculatura pulmonar, sabe-se que esta tem um papel essencial no controlo da maturação pulmonar fetal¹⁴⁷. Além disso, os recetores ErbB4, preferenciais para heterodimerização nas células epiteliais fetais tipo II, estão envolvidos na produção de surfactante alveolar¹⁴⁸ e a sua deleção provoca alterações na estrutura e função do sistema pulmonar, sugerindo uma importante ação deste tipo de recetores no desenvolvimento normal dos alvéolos¹⁴⁹. No pulmão adulto, as células epiteliais dos brônquios pulmonares expressão níveis elevados de ErbB2 e ErbB3 (comparativamente com a expressão de ErbB4 e ErbB1) e também são capazes de sintetizar e libertar NRG-1.

O papel do sistema NRG-1/ErbB a nível cardíaco, a sua interação com mediadores neuro-humorais, os seus efeitos a nível vascular e a sua presença em processos a nível pulmonar, são fatores que tornam pertinente o estudo do efeito do sistema NRG-1/ErbB a nível da HAP e da progressão para a IC direita.

Um outro aspeto que despertou o nosso interesse ao longo deste estudo foi o facto da existência de uma possível interação entre os sistemas NRG-1/ErbB e ET-1. Sabendo que a ET-1 é um dos principais agentes implicados na progressão da doença e um dos principais alvos da terapêutica atual, o conhecimento prévio de que a síntese endotelial de NRG-1 pode ser estimulada pela ET-1¹⁵⁰, e que os recetores ErbB interagem com os recetores ET_A¹⁵¹, tornam também pertinente o estudo da interação de ambos os sistemas no contexto de HAP e IC direita.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Tendo em conta toda a informação referida anteriormente, o presente estudo surge da hipótese de que a ativação do sistema NRG-1/ErbB, em animais com HAP, poderá vir a proteger os vasos pulmonares e melhorar a função ventricular direita e esquerda, promovendo o aumento da sobrevida animal. Com base nesta hipótese, é nosso objetivo geral investigar o papel do sistema da NRG-1 na fisiopatologia da HAP e na progressão para a IC ventricular direita e assim contribuir para o desenvolvimento de um novo potencial alvo terapêutico.

Para este trabalho de investigação foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a expressão de NRG-1, a nível pulmonar e cardíaco num modelo animal de HAP induzida pela monocrotalina (MCT);
- Avaliar a sobrevida, a função hemodinâmica e vascular pulmonar e o grau de HAP, *in vivo* (estudos hemodinâmicos e ecocardiográficos);
- Avaliar a estrutura e histologia do miocárdio e do pulmão e os seus perfis de expressão génica;
- Averiguar a interação dos sistemas NRG-1 e ET-1 no contexto da HAP e IC ventricular direita.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com a lei Portuguesa para o bem-estar animal e em conformidade com o *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Pub. No. 85-23, Revised 1996) e com a Direção Geral de Veterinária (DGV).

4.1 MODELO ANIMAL

FUNDAMENTOS

A maior parte da investigação experimental na área da HAP tem usado o modelo de HAP primária induzida pela MCT, em Rato. A MCT é caracterizada por produzir HAP, seguida de sobrecarga de pressão no VD, hipertrofia ventricular direita e eventualmente IC congestiva^{72,152-153}. Apesar de este modelo ter sido introduzido há mais de 50 anos e da existência de inúmeros estudos sobre a indução de alterações a nível pulmonar e cardíaco, semelhantes à HAP, o mecanismo fisiopatológico pela qual esta substância induz estas alterações ainda não se encontra totalmente esclarecido¹⁵⁴.

A MCT é um alcaloide pirrolizidínico derivado da *Crotalaria spectabilis* que, a nível experimental, pode ser administrado por via intraperitoneal, subcutânea ou por injeção intravenosa. Uma vez administrado em ratos, produz em 2 a 3 semanas, algumas características clínicas semelhantes à HAP idiopática em humanos¹⁵⁵.

A MCT é metabolizada ao nível do fígado, pelo citocromo P450, sendo convertida em pirróis como a dehidromonocratalina, sendo este um composto altamente tóxico e reativo, com uma semivida de aproximadamente 3 segundos em meio aquoso. Este composto, que circula associado aos eritrócitos, atinge primariamente o sistema arterial pulmonar, uma vez que o pulmão, depois do fígado, possui o maior sistema vascular do organismo¹⁵⁶.

Para além das suas ações nefastas a nível pulmonar, a MCT tem um efeito marcadamente tóxico ao nível de outros órgãos como o fígado e os rins. Este efeito altamente tóxico da MCT é uma das principais causas da alta taxa de mortalidade associada a este modelo animal, o que representa uma significativa limitação no seu uso. Para além da alta taxa de mortalidade, outras limitações apontadas ao uso da MCT compreendem a elevada variabilidade entre animais, associada à diferente sensibilidade que cada animal apresenta à MCT¹⁵⁷. Apesar das suas limitações, a escolha do modelo prende-se com o facto de este não implicar técnicas invasivas

(não sendo necessárias intervenções cirúrgicas na sua aplicação) e a HAP, a hipertrofia do VD e a IC desenvolvem-se rapidamente⁷². Outras das vantagens do uso deste modelo estão associadas ao facto de ser um modelo que está bem definido, reprodutível, ser dos modelos mais usados na investigação de novas opções terapêuticas para HAP, ser facilmente aplicável em laboratório e sobretudo o facto de até à data não ter sido comprovado qualquer efeito tóxico da MCT no miocárdio¹⁵⁸⁻¹⁵⁹.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Numa primeira fase foram selecionados, de forma aleatória, ratos *Wistar* machos (Laboratórios *Charles River*; Barcelona, Espanha) com peso médio entre 180-200g, para receber uma dose única de MCT (60mg/kg, *Sigma Chemical*), administrada por via subcutânea. Paralelamente, foi selecionado um grupo controlo, com número equivalente de ratos, ao qual foi injetado, na mesma altura, um volume igual de veículo (NaCl 0,9%).

Após 14 dias da injeção de MCT ou veículo, os animais de cada grupo foram novamente agrupados, aleatoriamente, de forma a obter 4 grupos distintos: 1) animais doentes sem tratamento (MCT), 2) animais doentes com tratamento (MCT+NRG-1), 3) animais controlo sem tratamento (CTRL) e 4) animais controlo com tratamento (CTRL+NRG-1). Os animais dos grupos MCT+NRG-1 e CTRL+NRG-1 foram submetidos a tratamento crónico com NRG-1 (40µg/Kg/dia, via intraperitoneal, durante 10 dias consecutivos). Aos animais dos grupos MCT e CTRL foi administrado um volume equivalente de veículo (solução de 0,1% de BSA - albumina sérica bovina).

Foram colocados 5 animais por caixa, num ambiente controlado, sob um ciclo luminosidade-obscuridade de 12:12h, com temperatura controlada a 22°C, com água e comida *ad libitum*. Os dados relativos à mortalidade foram registados diariamente.

Antes da administração da MCT ou de veículo, procedeu-se a uma avaliação ecocardiográfica de todos os ratos, não só com o intuito de fazer uma avaliação basal para comparação entre grupos experimentais, mas também para garantir que nenhum dos animais apresentava, no início do protocolo, nenhuma anomalia que pudesse interferir com os resultados (como patologia cardíaca ou defeitos congénitos).

Entre os 25-28 dias após a administração de MCT os animais sobreviventes de todos os grupos foram submetidos, a uma nova avaliação ecocardiográfica e posteriormente a uma avaliação hemodinâmica *in vivo*. No final de cada avaliação hemodinâmica, procedeu-se à colheita

e processamento de amostras para estudos funcionais vasculares, análise morfométrica, estudos histológicos e de biologia molecular.

4.2 ESTUDOS FUNCIONAIS

FUNDAMENTOS

Foram realizados estudos funcionais a todos os animais (avaliação ecocardiográfica e hemodinâmica) e adicionalmente foram selecionados aleatoriamente alguns animais para a realização do estudo funcional da artéria pulmonar. O objetivo foi avaliar a função cardíaca nos animais de todos os grupos, nomeadamente a função ventricular direita e esquerda, as alterações induzidas pelo desenvolvimento de HAP e o estado de IC direita.

Os exames ecocardiográficos periódicos permitiram a monitorização não-invasiva e a caracterização da progressão da HAP e da função ventricular.

Na avaliação hemodinâmica (técnica invasiva), a utilização de cateteres de pressão-volume permitiram determinar de forma mais precisa a função sistólica e diastólica (*in vivo*), incluindo a avaliação da tolerância diastólica à pós-carga, bem como, a resposta à administração crónica de NRG-1.

O estudo adicional de preparações de músculo liso da artéria pulmonar teve o objetivo de averiguar a função contráctil da artéria pulmonar, através da avaliação da sua capacidade de relaxamento e distensibilidade.

PROCEDIMENTO DA AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Após anestesia (50 mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilasina, via intraperitoneal), foi efetuada a avaliação ecocardiográfica transtorácica em modo bidimensional, modo-M, Doppler Pulsado, Doppler tecidual. Os estudos foram efetuados a partir das projeções paraesternal direita e esquerda, com o ecocardiógrafo *General Electrics Vivid 7*, equipado com uma sonda sectorial de 12 MHz. A sonda foi colocada em contacto com o pré-córdio após lubrificação com gel e foram obtidas imagens bidimensionais e em modo-M, em eixo curto de ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares. Avaliaram-se os diâmetros telediastólico e telessistólico dos ventrículos esquerdo e direito, as frações de encurtamento e de ejeção, as espessuras do septo e da parede posterior dos ventrículos. Em projeção apical de 4 e 5 cavidades, e após aquisição prévia de imagem bidimensional, foram avaliados por Doppler convencional o fluxo valvular mitral e tricúspide bem como o fluxo valvular aórtico e pulmonar.

A avaliação por Doppler tecidual (TDI) foi efetuada utilizando o perfil pulsado do Doppler tecidual. O TDI pulsado foi utilizado para avaliar a velocidade sistólica e diastólica do miocárdio. O TDI foi efetuado utilizando a projeção apical de 4 câmaras. A amostra de volume foi posicionada na região septal e lateral no local de inserção do anel mitral e foi obtida uma avaliação por TDI do ventrículo direito seguindo a mesma metodologia, mas utilizando a inserção do anel tricúspide. Foram obtidos ainda registos de uma região apical dos ventrículos direito e esquerdo, sendo que estes registos tiveram um mínimo de cinco batimentos cardíacos consecutivos de modo a minimizar a variabilidade induzida pela respiração. A análise do registo de TDI foi efetuada posteriormente utilizando o *software* apropriado do ecocardiógrafo. O sistema de ganhos e filtros foi ajustado de modo a eliminar o ruído e permitir um registo adequado de sinal de TDI¹⁶⁰⁻¹⁶¹.

PROCEDIMENTO DA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Após indução anestésica com recurso ao fentanil (100 µg/Kg) e midazolam (5 mg/Kg), administrados por via intraperitoneal, e inalação de sevoflurano a 8%, os animais foram entubados orotraquealmente. De seguida, foram ventilados mecanicamente, com o uso de um ventilador acoplado a um vaporizador de sevoflurano. A anestesia foi mantida pelo sevoflurano a 2,5% com ventilação mecânica e ajuste dos parâmetros ventilatórios por gasometrias seriadas.

Os animais foram posicionados numa placa de aquecimento de modo a minimizar as perdas de calor, e cateterizados na veia ilíaca direita, sendo a volemia reposta por infusão de 4mL/Kg.h⁻¹ de soro fisiológico aquecido. Realizou-se uma toracotomia esquerda com pericardiotomia ampla e inseriram-se cateteres de pressão-volume, pela cavidade do VE e do VD para avaliação das pressões e volumes (*Millar Instruments*, Houston, TX).

Após 15 minutos de estabilização do animal, foram efetuados os registos hemodinâmicos (aquisições feitas com a ventilação suspensa e no final da expiração). Foram registadas as pressões no VD e VE na telediastole e no pico de pressão sistólica e as velocidades máximas de subida (dp/dt_{max}) e queda (dp/dt_{min}) da pressão em ambos os ventrículos. A constante de tempo τ foi obtida ajustando a queda de pressão isovolumétrica a uma função monoexponencial. As manipulações agudas da pré-carga, através de oclusão regulada da veia cava, e da pós-carga, recorrendo à oclusão aórtica ou do tronco pulmonar, permitiram uma avaliação precisa das funções sistólica e diastólica do VD e do VE, através das curvas de pressão-volume telessistólica e telediastólica. Mais precisamente, as oclusões graduais da aorta e do tronco pulmonar, com aumento da pós-carga até que estas provoquem um relaxamento mais lento e um deslocamento para cima na curva de pressão-volume telediastólica, testaram a tolerância miocárdica dos dois

ventrículos à pós-carga aguda na HAP. No final das aquisições, e após a colheita de sangue, os ratos foram eutanasiados por exsanguinação após sobredosagem anestésica¹⁶².

PROCEDIMENTO DO ESTUDO DE PREPARAÇÕES DE MÚSCULO LISO DA ARTÉRIA PULMONAR

Em animais selecionados dos grupos CTRL, MCT e MCT+NRG-1, após indução anestésica, intubação orotraqueal e esternotomia, foi inserido no tronco pulmonar um cateter de pressão, através do VD para registrar a pressão da artéria pulmonar. Posteriormente os animais foram eutanasiados com pentobarbital de sódio (100mg.Kg⁻¹, via intraperitoneal), para retirar em bloco o coração e pulmões. Estes órgãos foram mantidos numa solução de Krebs-Ringer modificada (contendo em mM: 130 NaCl; 4,7 KCl; 1,18 KH₂PO₄; 1,17 MgSO₄; 14,9 NaHCO₃; 5,5 Glicose; 0,026 EDTA; 1,6 CaCl₂). De seguida, os anéis de artéria pulmonar comum, com cerca de 2 mm de comprimento, foram isolados e montados horizontalmente entre os pinos de aço inoxidável num sistema de banho de tecidos (720MO, DMT, Denmark), de forma a preservar a integridade do endotélio vascular. A solução dos banhos foi mantida ao longo de toda a experiência com 95% O₂ / 5% CO₂, a uma temperatura constante de 37 ° C e pH a 7,4, reproduzindo condições fisiológicas normais.

Os anéis arteriais foram estabilizados durante 60 minutos, seguido de um procedimento de normalização. As curvas tensão-comprimento foram ajustadas com o micrómetro e com as várias leituras da força do transdutor em cada vaso, sendo depois a tensão passiva em repouso definida para corresponder a cada animal onde foi medida a pressão pulmonar.

Após o procedimento de normalização, adicionou-se em cada banho 60 mM de KCl, com posteriores lavagens, de forma a testar a viabilidade do tecido e determinar a sua capacidade de resposta máxima.

A função endotelial foi confirmada através da capacidade da acetilcolina relaxar segmentos de artéria anteriormente contraídos com fenilefrina (10⁻⁷M). A curva de concentração-resposta à acetilcolina foi então obtida (10⁻⁹ a 10⁻⁵ M, com intervalo de 0.5^{-log} em cada adição), sendo que a resposta da acetilcolina é calculada através da percentagem de relaxamento em relação à contração máxima obtida com fenileferina.

Os sinais de tensão foram continuamente adquiridos e gravados digitalmente a uma taxa de amostragem de 1000Hz (ML866 PowerLab 30/04, ADInstruments Pty Ltd.), e posteriormente analisados através do software LabChart pro v7 (ADInstruments)¹⁶³.

4.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO E HISTOLÓGICO

FUNDAMENTOS

Uma vez que a HAP é caracterizada não só por alterações a nível fisiológico mas também a nível morfológico, como as descritas anteriormente, foi necessário efetuar tanto um estudo morfométrico como histológico do pulmão e coração. O objetivo desta avaliação foi essencialmente averiguar a ocorrência ou não de alterações celulares no tecido cardíaco como hipertrofia e fibrose, e avaliar alteração da composição da parede dos vasos pulmonares, verificando assim se o tratamento com NRG-1 interfere tanto nos processos hipertróficos como de remodelação do endotélio.

PROCEDIMENTO DA AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Durante todo o protocolo experimental, os animais antes de serem sacrificados foram pesados diariamente. Procurou-se fazer o registo do peso corporal sempre por volta da mesma hora do dia.

Após a eutanásia dos animais, recolheu-se cuidadosamente o pulmão e o coração, os quais foram imediatamente pesados. Depois de registar o peso total do coração, este foi dissecado e foi efetuada a pesagem separada do VD e do VE + septo. Para além disso foi registado o comprimento da tíbia dos animais. A normalização do peso foi feita tanto para o peso corporal do animal como para o comprimento da tíbia. Uma vez que os animais injetados com MCT, desenvolvem, em poucas semanas, caquexia (perda irreversível de massa corporal), a utilização do peso corporal não é a melhor medida de normalização, sendo que o uso do comprimento da tíbia fornece uma relação mais exata com os dados fisiológicos obtidos.

PROCEDIMENTO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras para histologia foram submersas numa solução fixadora de formol a 10%. Após o passo inicial de fixação, estas sofreram um processo de desidratação (com uso de etanol em percentagens decrescentes), um processo de diafanização (uso de xilol) e impregnação em parafina líquida (54°C). Posteriormente foram incluídas e orientadas corretamente em moldes metálicos, tendo-se efetuado cortes seriados a 4 μm , nas amostras de VD, e 3 μm , nos anéis das artérias pulmonares, num micrótomo tipo Minot. De forma a possibilitar a visualização ao microscópio ótico, recorreu-se a três técnicas de coloração das lâminas, sendo que estas foram ainda fotografadas com uma câmara digital (*Olympus XC30*) incorporada no microscópio.

Para a análise da área de secção e diâmetro dos cardiomiócitos, usou-se uma técnica de coloração básica com hematoxilina e eosina (HE). A hematoxilina cora de roxo/azul os núcleos e a eosina cora as restantes estruturas celulares de rosa ténue. Na determinação da área e diâmetro dos cardiomiócitos usou-se o programa *Cell B*. Para esta análise foi considerado o maior diâmetro da área de secção transversa de 10 cardiomiócitos seccionados transversalmente ao nível do núcleo. Os cardiomiócitos foram seleccionados aleatoriamente, a partir de 5 campos diferentes (num total de 50 fibras musculares analisadas por amostra).

Para análise da fibrose recorreu-se à coloração com *Red Sirius*, que cora o colagénio de vermelho intenso e as restantes estruturas celulares de um tom pálido. Para efetuar a quantificação em percentagem da área de fibrose recorreu-se ao programa *Image Pro Plus* (versão 6.0 – *Media Cybernetics inc.*). A quantificação de fibrose foi efetuada em 7 campos escolhidos aleatoriamente para cada animal/tecido e por dois observadores diferentes.

Na análise do espessamento da camada média das artérias pulmonares utilizou-se a coloração de *Van Gieson*, que cora os núcleos de azul-escuro/preto, a cartilagem de azul, o colagénio (fibras de colagénio e membranas basais) de vermelho e as restantes estruturas de amarelo (fibras elásticas, citoplasma de células epiteliais e musculares). Determinou-se a área e a espessura das artérias com o auxílio do programa *Cell B*, efetuando-se entre 8 a 12 medições por cada artéria.

4.4 ESTUDO MOLECULAR

FUNDAMENTOS

Neste trabalho o estudo molecular teve como objetivo determinar a expressão génica da NRG-1 e de algumas das principais proteínas alteradas no decurso da patologia e com especial relevo no contexto de HAP e IC direita. O intuito foi tentar descrever as alterações na expressão de NRG-1 face ao desenvolvimento da patologia, e tentar compreender a evolução da expressão de outras proteínas face à administração de NRG-1.

Paralelamente ao estudo central em análise, foi possível efetuar a análise do comportamento da expressão génica de NRG-1 no VD, usando animais MCT tratados com um dos principais fármacos usados no tratamento crónico, o Bosentan (200mg/kg/dia durante 21 dias).

Este estudo foi possível através da cedência de amostras de VD por parte de um grupo de investigação que usou o mesmo modelo de HAP e procedimentos muito similares aos usados neste trabalho.

PROCEDIMENTO

As amostras recolhidas para posterior análise molecular foram armazenadas em *RNAlater* (Quiagen), imediatamente congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C até serem processadas.

O ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) total foi extraído pelo método da membrana de sílica e guanidínio-tiocianato (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen, 74104) de acordo com as instruções do fabricante. A sua concentração e a pureza foram posteriormente medidas por espectrofotometria (Eppendorf, 6131000.012), assumindo-se como *ratio* ideal valores de A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,1.

A quantificação relativa da expressão do ARNm de interesse foi efetuada por *two-step real-time polimerase chain reaction*. Para todos os genes e tecidos estudados, usando amostras de animais do grupo controlo, foram construídas curvas padrão por correlação entre a quantidade inicial de ARNm total e o ciclo de *threshold* (método do máximo da segunda derivada).

A transcrição reversa (RT) foi realizada num termociclador convencional (Whatmann Biometra, 050-901), usando 40U/reação de enzima transcriptase reversa (*Super Script II Kit*, Invitrogen, 18064-014), 10mM de ditioneitol (DTT), 30ng/ml de *random primers* (Invitrogen 48190-011), 20U/reação de *RNase inhibitor* (Promega N2515), 0,5mM de nucleotídeos (dNTP's) (MBI Fermentas R0192) e 1,9mM de $MgCl_2$, para um volume total de reação de 20µL. O programa de RT consistia em 10 min a 22°C, 50 min a 50°C e 10 min a 95°C.

Dez por cento do ácido desoxirribonucleico complementar (ADNc) obtido, foi amplificado e detetado por *real-time PCR* (LightCycler II, Roche) usando sondas SYBR Green (*SYBR Green Kit*, Quiagen, 204143) de acordo com as instruções do fabricante. As curvas de amplificação foram analisadas, usando o *Software* do equipamento, através de quantificação absoluta.

As curvas de *melting* de cada reação de PCR foram tidas em conta de forma a excluir a formação de dímeros de *primers* e de produtos inespecíficos, confirmando assim a pureza do produto amplificado. Usou-se como gene normalizador o GAPDH, visto não se verificarem diferenças significativas entre os diferentes grupos em estudo. Os resultados finais da expressão génica foram expressos em unidades arbitrárias (UA), sendo que a média do grupo controlo, após normalização pelo GAPDH, corresponde a 1 UA. Todos os ensaios foram realizados em duplicado, de forma a garantir a segurança nos resultados obtidos¹⁶⁴.

Os *primers* usados na análise molecular foram desenhados *in-house* com recurso a *software* apropriado (DNASTar™). Na tabela seguinte encontra-se as sequências referentes aos pares de *primers* usados (tabela III).

Tabela III. Pares de *Primers* usados

<i>Gene</i>	<i>Sequência dos Primers</i>
GAPDH	P ₁ - 5' TGG CCT TCC GTG TTC CTA CCC ^{3'} P ₂ - 5' CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT ^{3'}
NRG-1	P ₁ - 5' AAG CTG GCC ATT ACG TAG TTT TG ^{3'} P ₂ - 5' TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC ^{3'}
ET-1	P ₁ - 5' CGG GGC TCT GTA GTC AAT GTG ^{3'} P ₂ - 5' CCA TGC AGA AAG GCG AAT GTG ^{3'}
BNP	P ₁ - 5' CAG AGC TGG GGA AAG AAG AG ^{3'} P ₂ - 5' GGA CCA AGG CCC TAC AAA AGA ^{3'}
IL6	P ₁ - 5' GAA GTT GGG GTA GGA AGG AC ^{3'} P ₂ - 5' CCG TTT CTA CCT GGA GTT TG ^{3'}
TNF-α	P ₁ - 5' TGG GCT ACG GGC TTG TCA CTC ^{3'} P ₂ - 5' GGG GGC CAC GCT CTT C ^{3'}

4.5 ANÁLISE E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para a análise estatística e representação gráfica dos dados obtidos foram usados os programas, *SigmaStat* (vs.3.5), *SigmaPlot* (vs.12) e *GraphPad Software* (vs.5). Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão da média, e aplicou-se o *Two Way ANOVA* nas análises comparativas, usando um nível de significância de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDOS FUNCIONAIS

5.1.1 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Na primeira avaliação ecocardiográfica basal do sistema cardiovascular, realizada antes da administração da MCT, não foram registadas quaisquer diferenças significativas, tanto a nível morfológico como funcional, entre os animais incluídos no estudo. No entanto, após 4 semanas da administração da MCT, na segunda avaliação ecocardiográfica, foi possível verificar diferenças significativas entre os diferentes grupos (fig.10). As imagens que se seguem são representativas dos resultados da avaliação ecocardiográfica bidirecional de eixo curto e permitem-nos ter uma ideia geral das diferenças encontradas na morfologia ventricular dos animais dos grupos CTRL e MCT.

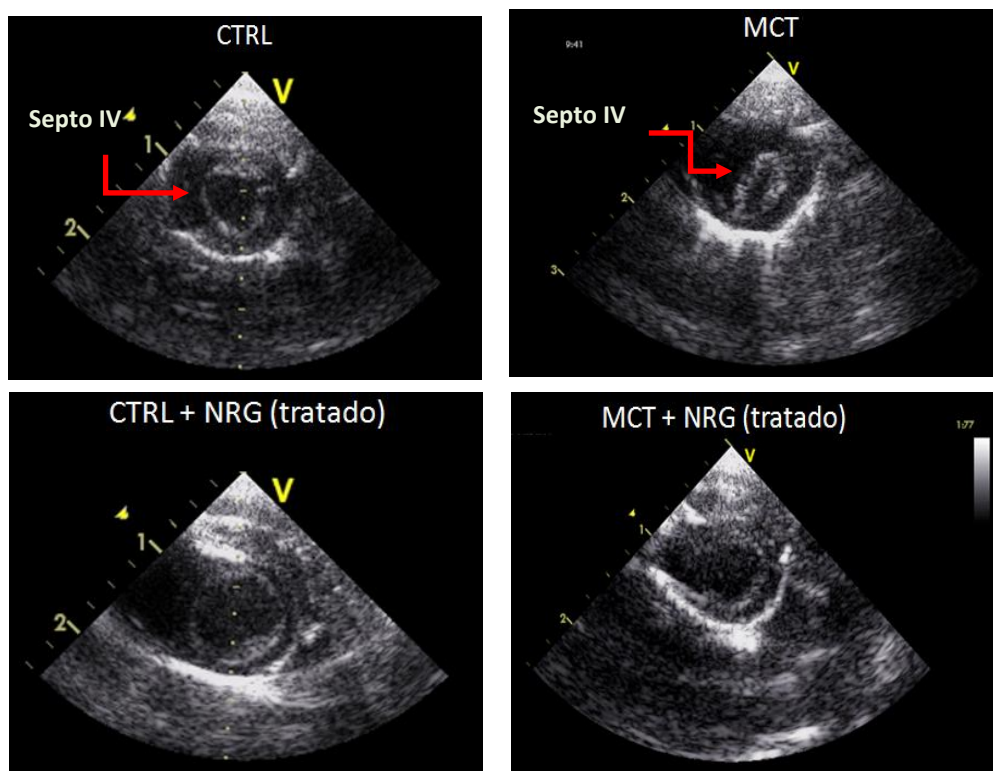


Fig. 10 Imagens representativas da avaliação ecocardiográfica transtorácica em modo bidimensional (Eixo paraesternal esquerdo), em animais de cada grupo experimental (após 4 semanas de administração de MCT).

No grupo MCT verificou-se uma acentuada dilatação do VD, com consequente deslocamento do septo interventricular (IV) em direção ao VE, consistente com as alterações geométricas a nível cardíaco comuns a vários tipos de HAP em humanos. Nesta avaliação

verificámos também que a morfologia do VD no grupo MCT+NRG-1 apresentava-se próxima da observada nos grupos CTRL e CTRL+NRG-1.

Confirmámos a presença de dilatação no VD nos animais do grupo MCT (fig.11), através da análise do diâmetro do VD (calculado a partir da distância entre a parede livre do VD e o septo interventricular ao nível da implantação da válvula tricúspide) (CTRL=5,00±0,08mm vs MCT=5,56±0,19mm). O grupo MCT+NRG-1 apresentou valores próximos dos grupos controlo (MCT+NRG-1=4,89±0,20mm).

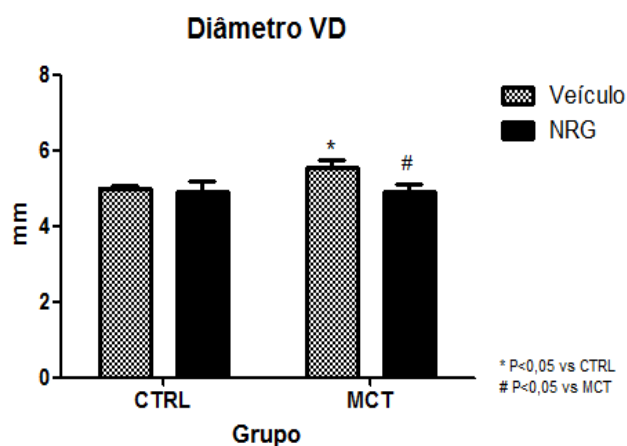


Fig. 11 Diâmetro do VD.

Através de Doppler pulmonar (fig.12), verificámos também a ocorrência de regurgitação pulmonar (retorno de sangue da artéria pulmonar para o VD) apenas no grupo MCT, enquanto os restantes grupos apresentaram um padrão de fluxo normal (triangular). Os dados obtidos na determinação da insuficiência da válvula pulmonar e do fluxo da válvula pulmonar vieram confirmar a existência de regurgitação pulmonar apenas no grupo MCT (fig.13 e 14), uma vez que estes apresentaram valores elevados de insuficiência da válvula pulmonar (MCT=0,80±0,27m/seg vs CTRL=0,00±0,00m/seg) e um fluxo valvular inferior aos restantes grupos (MCT=0,78±0,07 vs CTRL=1,12±0,03).

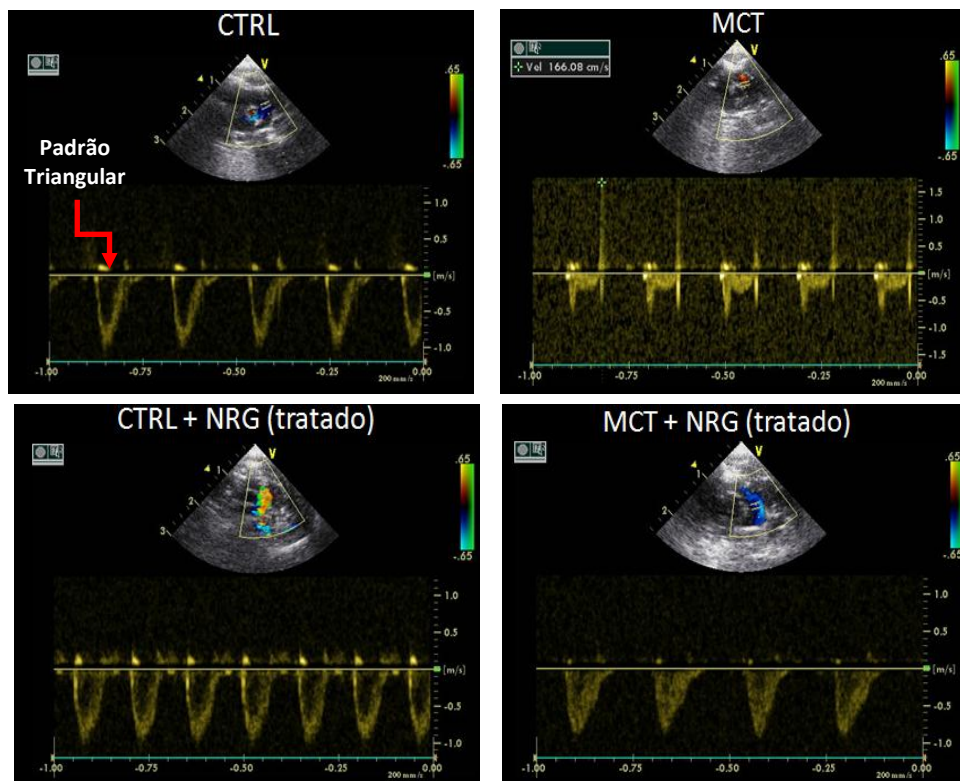


Fig. 12 Imagens de Doppler pulmonar nos diferentes grupos experimentais

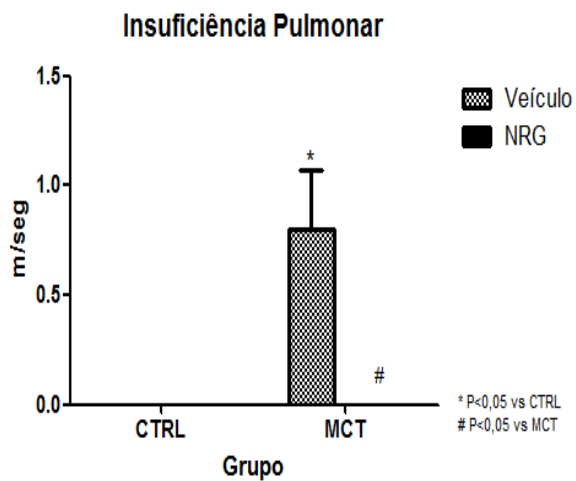


Fig. 13 Grau de insuficiência da válvula pulmonar.

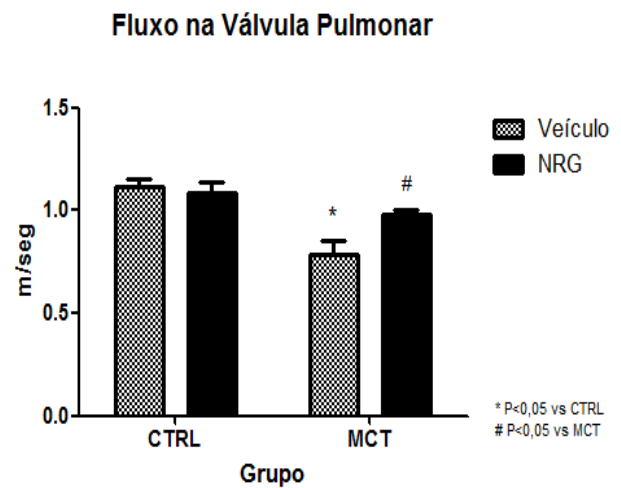


Fig. 14 Fluxo na válvula pulmonar.

Foi também possível verificar no grupo MCT, um elevado retorno de sangue do VD, durante a sua contração, para a aurícula direita, por insuficiência da válvula tricúspide (fig.15). Contudo, mais uma vez observou-se que o grupo MCT+NRG-1 apresentava valores muito similares aos grupos controlo.

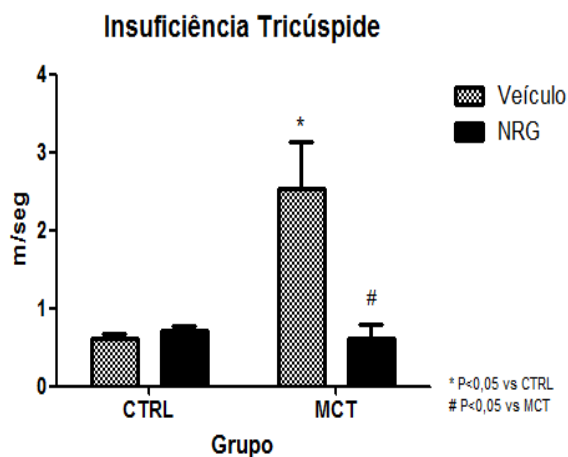


Fig. 15 Insuficiência da válvula tricúspide.

Outro dos parâmetros analisados e que permite inferir sobre a PAPm foi o tempo de aceleração na artéria pulmonar (Fig.16). No grupo MCT o tempo de aceleração do fluxo foi bastante reduzido, comparativamente com o grupo CTRL (MCT=17,97±2,29ms vs CTRL=25,86±1,46ms). Um tempo de aceleração mais curto é traduzido por uma PAPm elevada, o que é consistente com um estado de HAP. No caso do grupo MCT+NRG-1, verificou-se um tempo de aceleração quase sobreponível ao apresentado pelos grupos controlos.

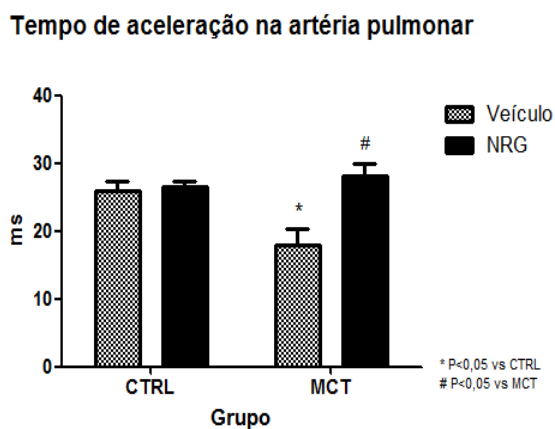


Fig.16 Tempo de aceleração na artéria pulmonar.

5.1.2 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Os parâmetros hemodinâmicos avaliados encontram-se sumariados na tabela IV.

Quanto à capacidade funcional do VD, verificou-se um aumento significativo na pressão sistólica nos animais dos grupos MCT e MCT+NRG-1, comparativamente com os dos grupos CTRL, embora no grupo MCT+NRG-1 esse aumento não tenha sido tão acentuado. Ainda foi possível verificar que, no grupo MCT+NRG-1, o valor do dp/dt_{max} (velocidade máxima de elevação da pressão), aumentado no grupo MCT, foi atenuado com o tratamento crónico, aproximando-se dos valores observados nos animais dos grupos CTRL.

Relativamente ao VE, a pressão sistólica e o dp/dt_{max} estavam significativamente diminuídos no grupo MCT, quando comparado com o grupo controlo, verificando-se assim uma diminuição da pré-carga no VE. Esta diminuição, em ambos os parâmetros, é claramente atenuada com o tratamento crónico dos animais com NRG-1.

Relativamente ao débito cardíaco, como seria de esperar, verificou-se uma redução significativa nos animais do grupo MCT, em relação aos animais do grupo CTRL. Porém, nos animais do grupo MCT+NRG-1 a diminuição do débito cardíaco foi atenuada.

Tabela IV. Parâmetros basais recolhidos durante a avaliação hemodinâmica. *P < 0,05 vs CTRL; # P < 0,05 vs MCT

	<i>CTRL</i>	<i>CTRL+NRG-1</i>	<i>MCT</i>	<i>MCT+NRG-1</i>
Débito cardíaco (mL/min)	61,7±4,2	58,8±5,7	32,8±5,5*	53,7±2,9*#
Ventrículo direito				
Pressão sistólica (mmHg)	32,8±0,7	34,0 ±2,0	67,4±3,7*	52,1 ±3,0*#
dp/dt_{max} (mmHg/s)	2504±162	2170 ±292	3597±175*	2930±253*#
Pressão telediastólica (mmHg)	2,4±0,3	2,9 ±0,3	3,9±0,5*	2,9 ±0,3#
Ventrículo esquerdo				
Pressão sistólica (mmHg)	126,1±3,4	119,0 ±4,5	94,8±5,9*	110,1 ±3,9*#
dp/dt_{max} (mmHg/s)	10630±741	9980 ±290	6023±999*	9440±930*#
Pressão telediastólica (mmHg)	5,3±0,8	4,9 ±1	5,5 ±1	4,4 ±0,6

5.1.3 ESTUDO DE PREPARAÇÕES DE MÚSCULO LISO DA ARTÉRIA PULMONAR

O gráfico que se segue (fig.17) apresenta as curvas dose-resposta do endotélio vascular da artéria pulmonar à acetilcolina. Em segmentos de artérias pulmonares previamente contraídos com fenileferina, a acetilcolina (10^{-9} a 10^{-5} M) causou relaxamento, dependente da concentração. A resposta à acetilcolina foi significativamente reduzida em artérias do grupo MCT, quando comparado com as do grupo CTRL, sendo que o relaxamento das artérias pulmonares, neste grupo, não ultrapassou os 40%. Nas artérias pulmonares dos animais tratados (MCT+NRG-1) verificou-se um relaxamento significativamente superior ao observado nos animais MCT, embora sem atingir a percentagem de relaxamento máxima observada no grupo CTRL.

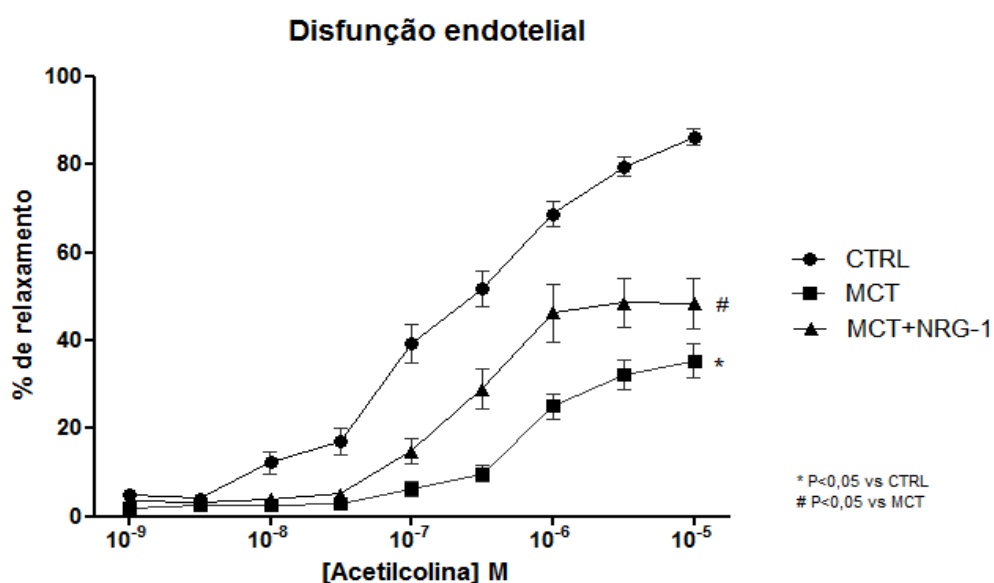


Fig.17 Curva dose-resposta à acetilcolina.

5.2 ESTUDO MORFOMÉTRICO E HISTOLÓGICO

5.2.1 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Ao longo das 4 semanas de tratamento, sobretudo a partir da 2ª semana, através de exame físico, verificou-se uma perda progressiva de peso corporal nos animais MCT, comparativamente com os restantes grupos. Relativamente ao peso do coração normalizado para o peso corporal, verificou-se que no grupo MCT o coração apresentava um peso superior ao grupo CTRL (MCT= $4,26 \pm 0,14$ g/Kg vs CTRL= $3,10 \pm 0,06$ g/Kg) (fig.18). Uma vez que o peso corporal é afetado pela exposição à MCT, este parâmetro não seria a melhor medida de normalização. De

forma a obter resultados mais exatos, o peso do VD e do pulmão foram normalizados para o comprimento da tibia. Foi possível observar no grupo MCT, comparativamente com o grupo CTRL, um aumento significativo tanto no peso do pulmão (MCT=0,742±0,034g/cm vs CTRL=0,437±0,024g/cm) como do VD (MCT=0,076±0,002g/cm vs CTRL=0,044±0,001g/cm) (fig.19 e 20). Ambos os indicadores de congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita, respetivamente, foram atenuados com o tratamento crónico com NRG-1 (Pulmão: MCT+NRG-1=0,618±0,036g/cm, VD:MCT+NRG-1=0,057±0,003g/cm). Nos distintos parâmetros morfométricos medidos não foram verificadas diferença entre os grupos CTRL e CTRL+NRG-1.

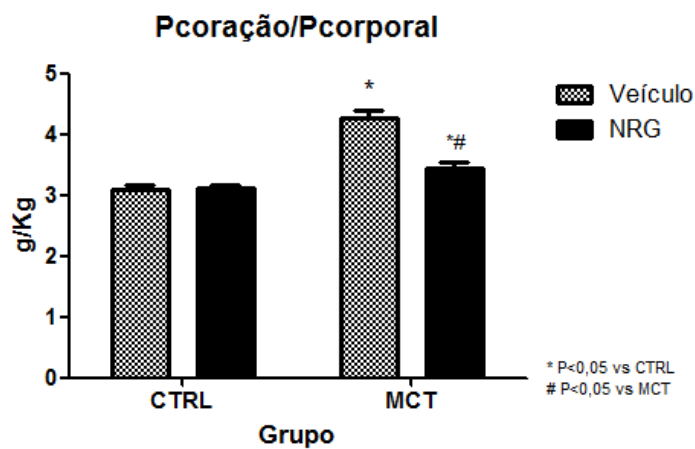


Fig.18 Razão peso coração/ peso corporal

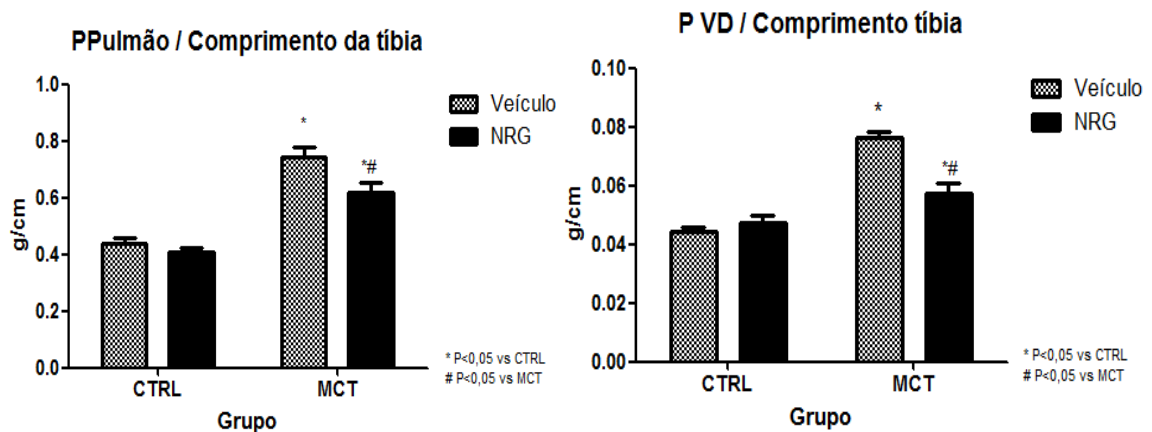


Fig.19 Razão peso do pulmão/ comprimento da tibia.

Fig.20 Razão peso do VD/ comprimento da tibia.

5.2.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A nível cardíaco, foi possível averiguar o estado de hipertrofia do VD através da avaliação do diâmetro e área de secção dos cardiomiócitos (fig.21, 22 e 23) e da percentagem de fibrose (fig.24 e 25). No grupo MCT verificou-se um aumento significativo tanto no diâmetro (MCT=25,35±1,20µm vs CTRL=20,84±1,02µm) como na área de secção dos cardiomiócitos (MCT=536,67±59,46µm vs CTRL=375,39±47,43µm²), resultado consistente com um estado de hipertrofia do VD na HAP.

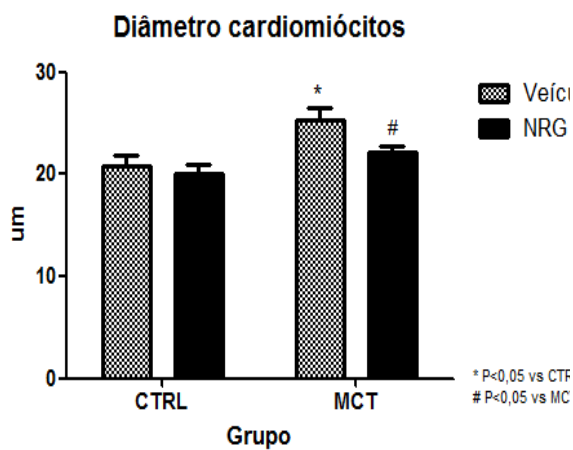


Fig.21 Diâmetro dos cardiomiócitos.

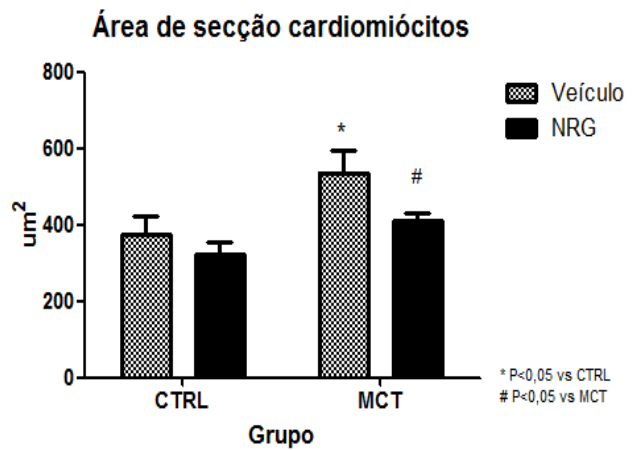


Fig.22 Área de secção dos cardiomiócitos.

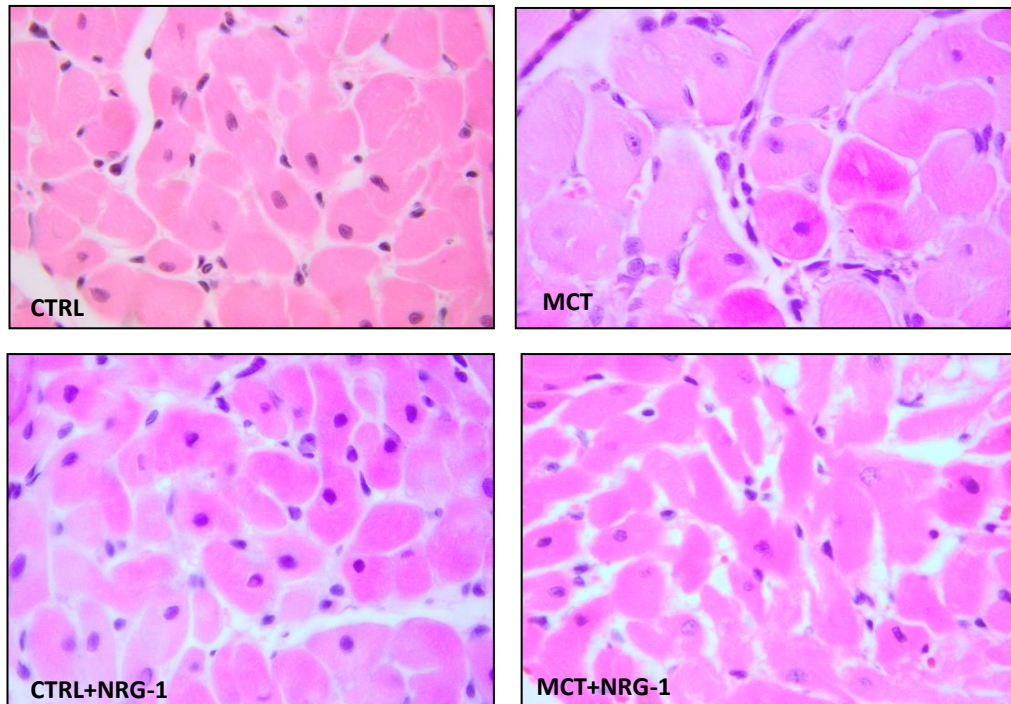


Fig.23 Imagens representativas do tamanho dos cardiomiócitos (coloração: HE, ampliação: 400x).

Nos animais MCT+NRG-1 observou-se uma atenuação em ambas as alterações (MCT+NRG-1= $22,18 \pm 0,61 \mu\text{m}$ e $409,01 \pm 19,72 \mu\text{m}^2$), comparativamente com os animais do grupo MCT.

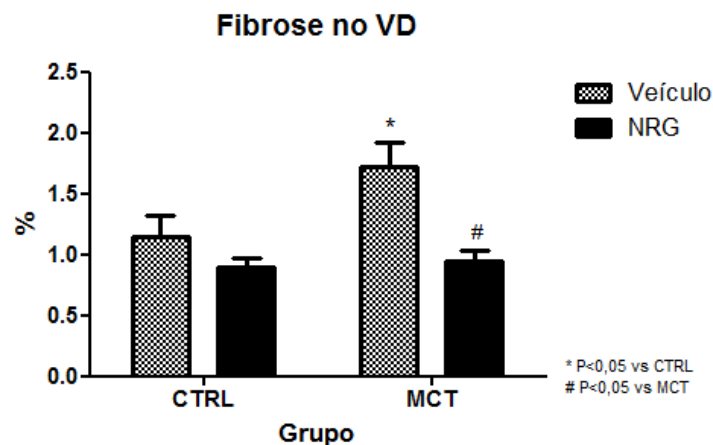


Fig.24 Percentagem de fibrose no VD.

Relativamente à percentagem de fibrose no VD, verificou-se um aumento de fibrose no grupo MCT (MCT= $1,73 \pm 0,64\%$ vs CTRL= $1,15 \pm 0,50\%$) e uma reversão completa da fibrose no grupo MCT+NRG-1 ($0,95 \pm 0,25\%$).

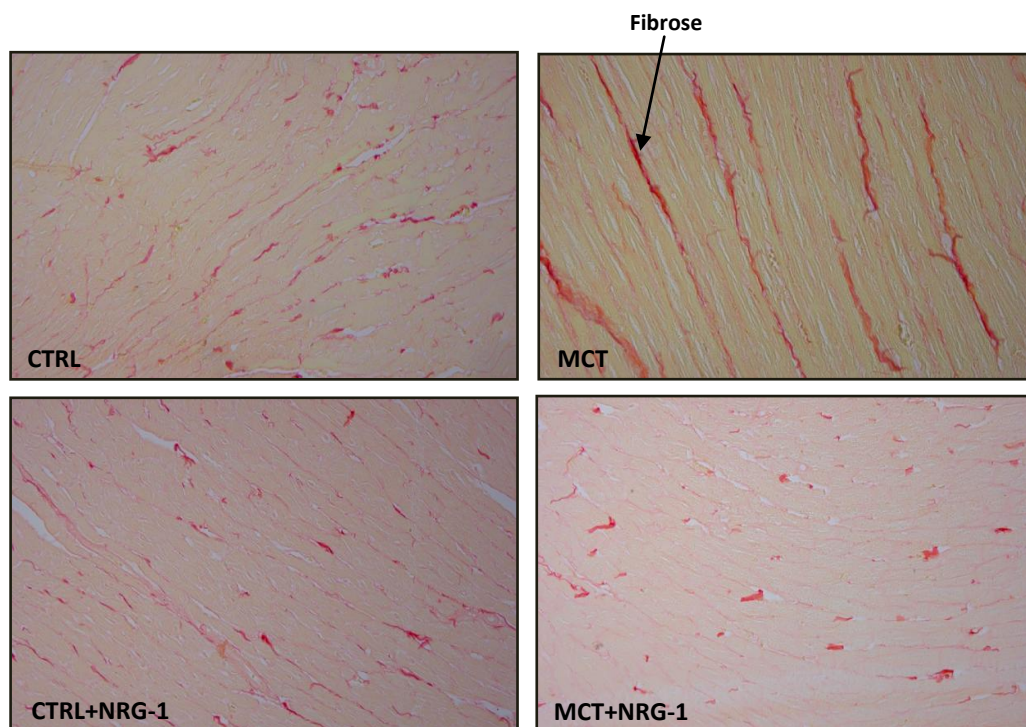


Fig.25 Imagens representativas da fibrose no VD (coloração. *Red Sirius*, ampliação: 100x).

A nível vascular foram analisados anéis da artéria pulmonar (fig.26 e 27), provenientes do estudo funcional, nos quais se analisou a espessura da camada média do vaso. A normalização foi efetuada para o tamanho do lúmen do vaso. Verificou-se um espessamento da camada média nos vasos do grupo MCT (MCT=41,23±1,48% vs 31,97±2,99%), ausente no grupo MCT+NRG-1 (MCT+NRG-1=29,56±2,46%).

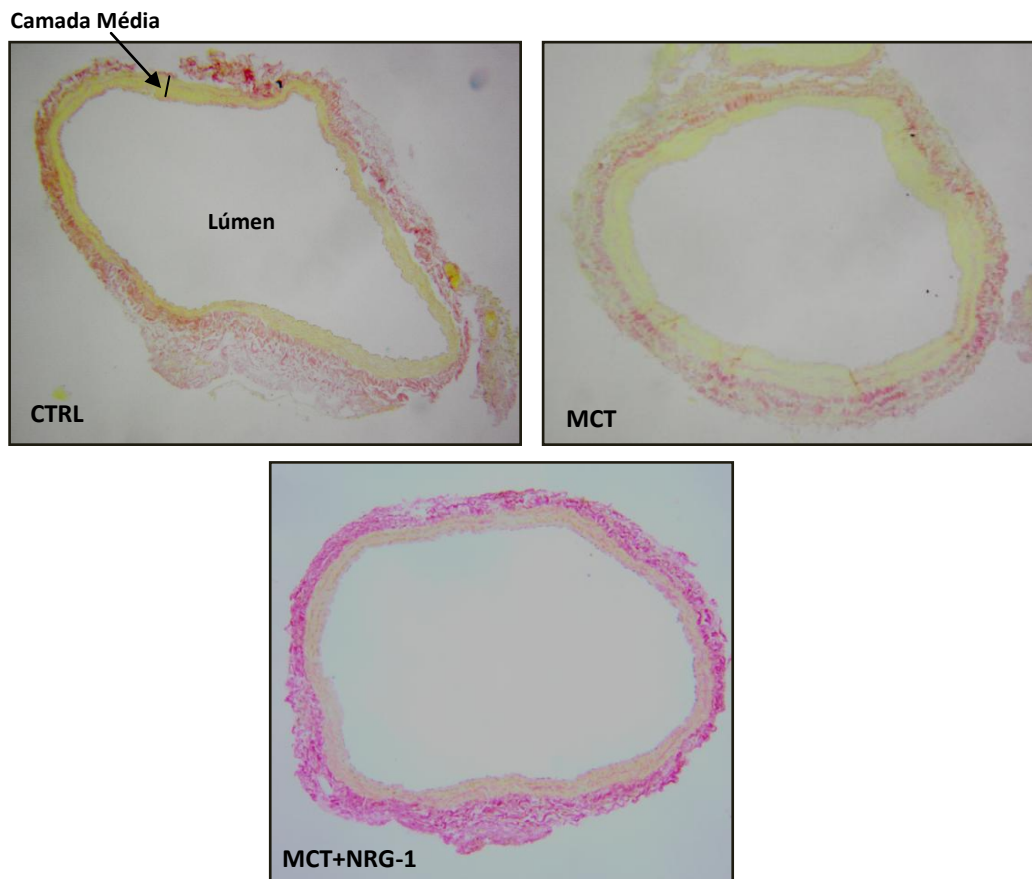


Fig.26 Imagens representativas dos anéis da artéria pulmonar (coloração: Van Gieson).

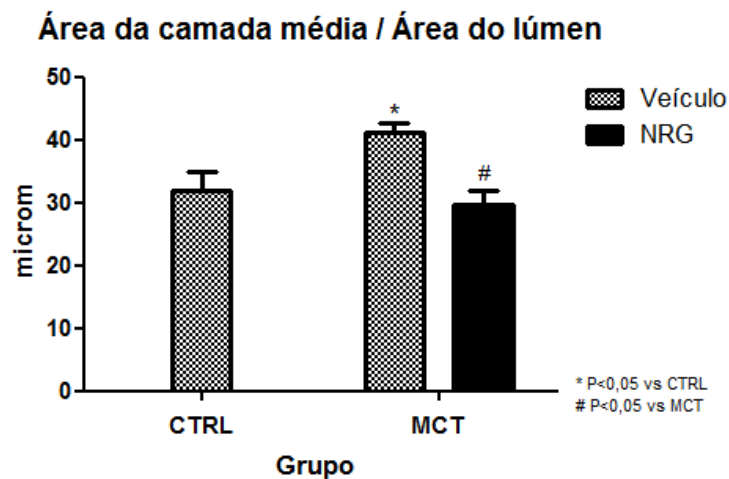


Fig.27 Razão área da camada média/ área do lúmen do vaso.

5.3 ESTUDO MOLECULAR

Numa primeira abordagem, a nível molecular determinou-se a expressão de ARNm de NRG-1 no VD (fig.28). Verificou-se que no grupo MCT estes níveis estavam bastante aumentados relativamente aos restantes grupos em estudo (MCT=11,05±2,80 UA). Por outro lado, verificou-se que a administração crónica de NRG-1 em animais controlo não induziu alterações significativas na expressão de NRG-1 (CTRL+NRG-1=1,65±0,35 UA vs CTRL=1,00±0,30 UA), no entanto, em animais doentes verificou-se uma redução significativa da expressão de NRG-1 (MCT+NRG-1=0,73±0,50 UA), para valores próximos dos controlos.

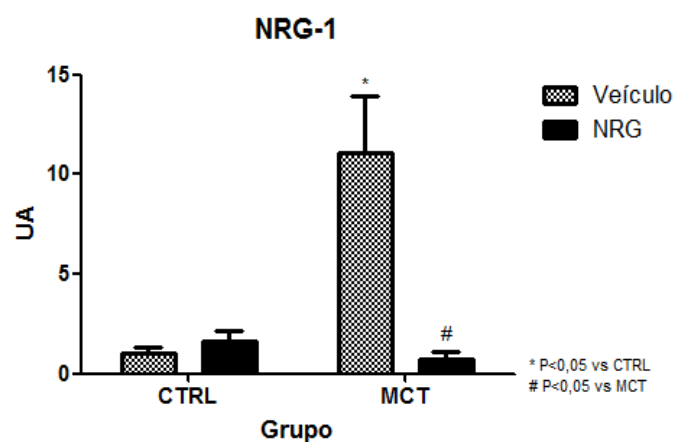


Fig.28 Níveis de ARNm de NRG-1 no VD.

Posteriormente, determinaram-se os níveis de expressão de ET-1 e do peptídeo natriurético tipo B (BNP), dois agentes que normalmente nos dão indicação do estado de sobrecarga e hipertrofia ventricular (fig.29 e 30). Detetaram-se níveis elevados tanto de ET-1 como de BNP no grupo MCT (ET-1: MCT=5,0 UA e BNP: MCT=17,5 UA). No grupo MCT+NRG-1 verificou-se uma redução significativa na expressão de BNP (MCT+NRG-1=5,6 UA) e uma reversão completa dos níveis de ET-1 (MCT+NRG-1=1,5 UA).

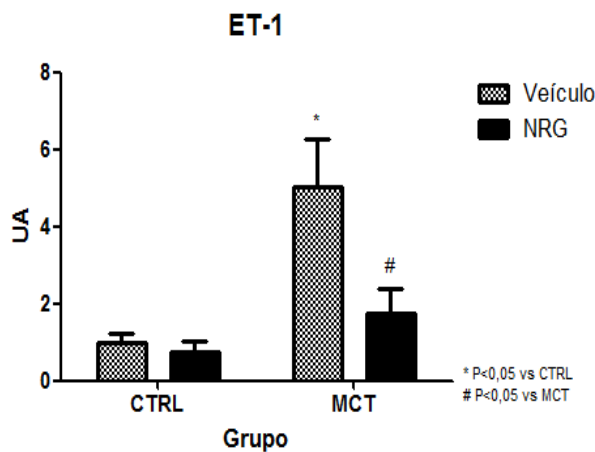


Fig.29 Níveis de ARNm de ET-1 no VD.

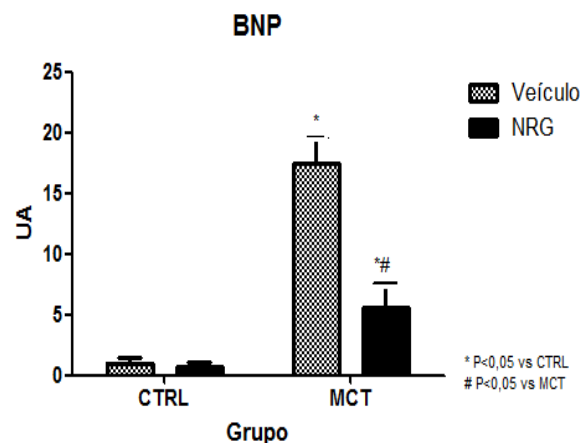


Fig.30 Níveis de ARNm de BNP no VD.

Para avaliar o grau de resposta inflamatória a nível ventricular direito efetuou-se a análise da expressão génica de TNF- α e IL6, não se verificando porém alterações significativas na expressão de ambas as proteínas entre os diferentes grupos em estudo (Fig.31 e 32).

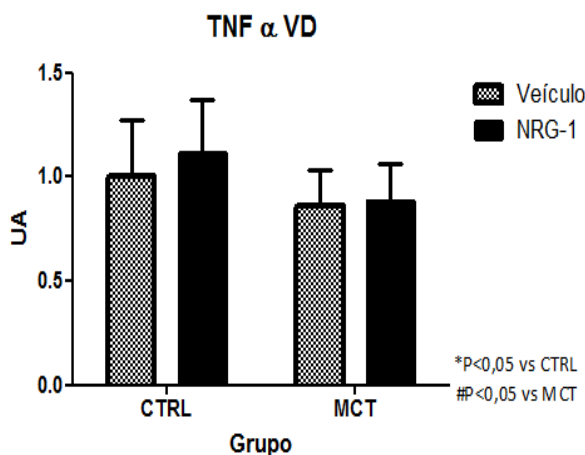


Fig.31 Níveis de ARNm de TNF- α no VD.

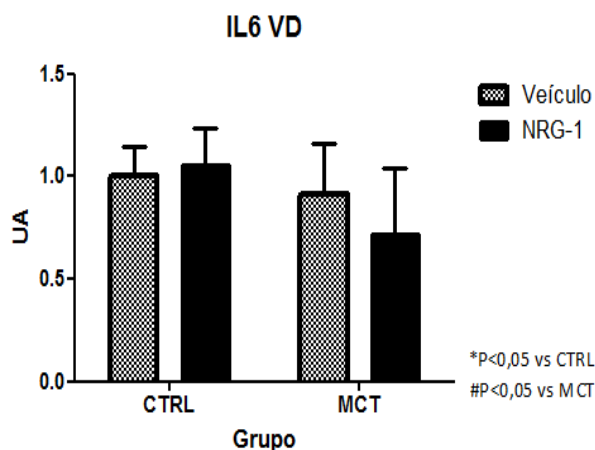


Fig.32 Níveis de ARNm de IL6 no VD.

Paralelamente a este estudo, foi também possível determinar a expressão génica de NRG-1 em animais MCT tratados com Bosentan, provenientes de outro grupo experimental (fig.33). Observou-se uma redução nos níveis de NRG-1 nos animais tratados (MCT+bos), comparativamente com o grupo MCT (MCT=11,05 \pm 2,80UA vs MCT+bos=3,79 \pm 1,47UA).

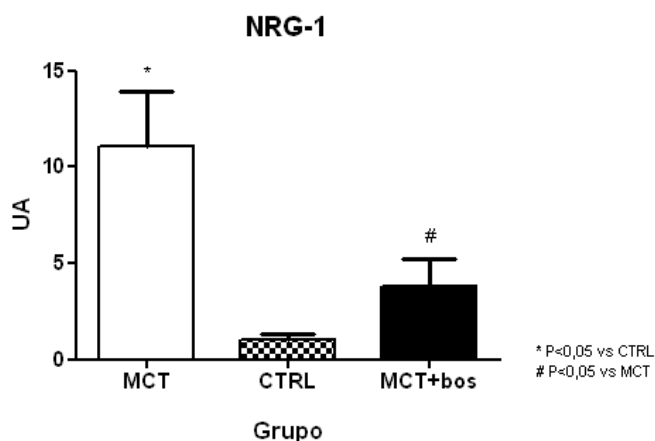


Fig.33 Níveis de ARNm de NRG-1 no VD de animais provenientes do estudo do tratamento crónico com Bosentan.

Relativamente ao pulmão, efetuou-se a determinação da expressão de NRG-1, IL6 e TNF- α . Quanto á expressão de NRG-1 não se observaram diferenças significativas entre os grupos MCT e CTRL (MCT=0,821 \pm 0,107 UA vs CTRL=1,00 \pm 0,271 UA). A administração crónica de NRG-1 não teve efeito a nível da expressão NRG-1 no pulmão (fig.34).

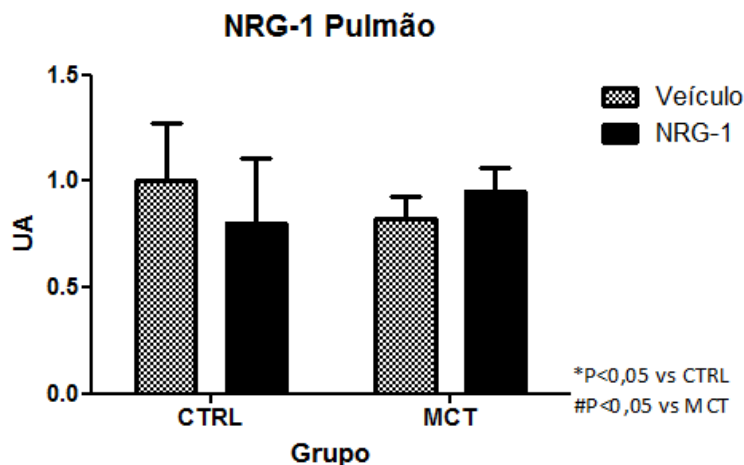


Fig.34 Níveis de ARNm de NRG-1 no pulmão

No que diz respeito às citocinas pró-inflamatórias, não se observaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis de ARNm de TNF- α , embora se verifique uma tendência para níveis mais elevados em ambos os grupos de animais doentes (MCT=1,44 \pm 0,27 UA, MCT+NRG-1=1,39 \pm 0,38 UA vs CTRL=1,00 \pm 0,15 UA) (fig.35). Quanto à expressão de IL6 observou-se um aumento significativo da sua expressão no grupo MCT (MCT=3,51 \pm 0,83 UA vs CTRL=1,00 \pm 0,25). No grupo tratado com NRG-1 verificou-se um ligeiro decréscimo da expressão de IL6, no entanto, esta diferença não é estatisticamente significativa quando comparada com o grupo MCT (MCT+NRG-1= 2,41 \pm 0,47 UA) (fig.36).

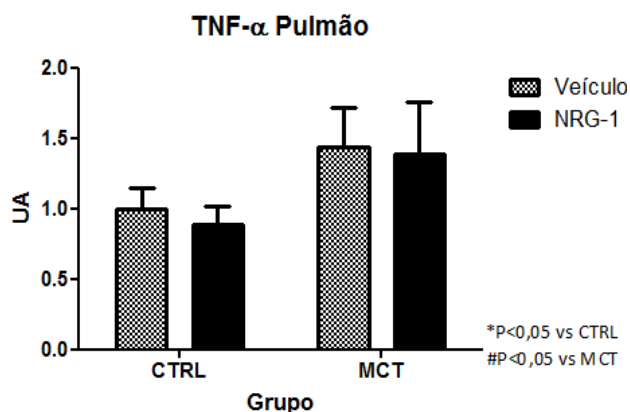


Fig.35 Níveis de ARNm de TNF- α no pulmão.

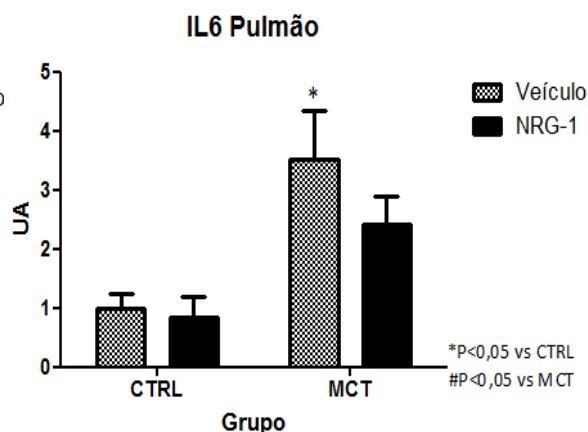


Fig.36 Níveis de ARNm de IL6 no pulmão.

5.4 ANÁLISE DA SOBREVIDA

Após 4 semanas da administração de MCT, foi possível observar através de exame físico sinais de doença no grupo MCT, como perda intensificada de massa muscular, dispneia, patas e focinho cianóticos, pelo quebradiço e letargia. Relativamente ao grupo MCT+NRG-1 estas alterações foram menos evidentes.

Até à data, ainda não foi possível a determinação das repercussões do tratamento crônico com NRG-1 na sobrevida dos animais com HAP e IC induzida pela MCT, uma vez que todos os animais sobreviventes foram sacrificados entre os 25-28 dias. No entanto, com os dados disponíveis até ao 24º dia após a administração de NRG-1, procedemos a uma análise da taxa de sobrevivência. Verificámos que a sobrevivência no grupo MCT era de 70% enquanto no grupo MCT+NRG-1 era de 89%, diferenças estas que não se revelaram, para já, estatisticamente significativas (fig.37).

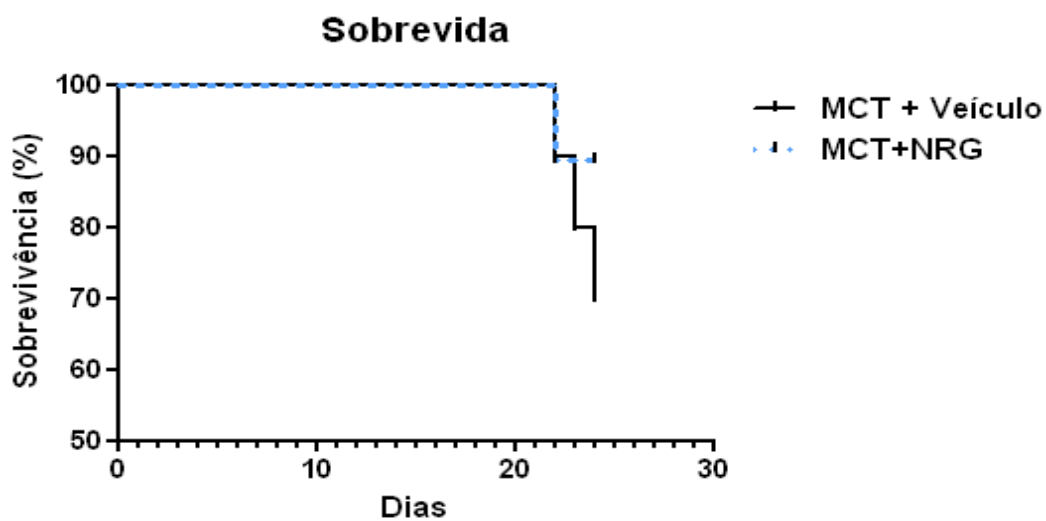


Fig. 37 Análise da sobrevida dos animais MCT (com e sem tratamento)

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

6. DISCUSSÃO

Os trabalhos experimentais desta tese são os primeiros a revelar a importância fisiopatológica e terapêutica do sistema NRG-1/ErbB na HAP e IC ventricular direita.

O modelo animal, selecionado para o estudo, modelo de HAP induzido pela MCT é um dos mais utilizados na investigação da fisiopatologia da HAP, bem como no estudo de novas abordagens terapêuticas, uma vez que apresenta grandes semelhanças histopatológicas com HAP idiopática¹⁵³. O facto de neste modelo estar envolvido um perfil de ativação neuro-humoral muito similar ao que ocorre no desenvolvimento da IC¹⁵², e de até à data não ter sido comprovado qualquer efeito tóxico direto da MCT a nível do miocárdio¹⁵³, tornam este num bom modelo de estudo de HAP.

Apesar de poder ser aplicado em vários tipos de animais, neste trabalho em específico usaram-se Ratos *Wistar*, uma vez que esta parece ser a espécie animal que apresenta uma resposta mais consistente e previsível à indução de HAP pela MCT⁷⁶.

As alterações a nível pulmonar e cardíaco induzidas pela MCT, estão devidamente documentadas, em diversos estudos⁶², e a sua principal via de ação parece ser a promoção de stress oxidativo¹⁶⁵. A MCT induz graves lesões ao nível do sistema pulmonar, como edema intersticial, inflamação, hemorragias, fibrose, hipertrofia da camada média dos vasos, vasoconstricção e aumento da rigidez das artérias⁷⁵. Todas estas alterações são responsáveis pelo aumento da resistência vascular pulmonar, que, conseqüentemente, induz uma sobrecarga no VD, conduzindo inevitavelmente a um estado de IC. A IC induzida pela MCT assemelha-se quer em termos morfológicos, quer funcionais, à patologia no Homem.

A IC é uma patologia caracterizada pela redução na capacidade de enchimento ou ejeção ventricular que pode estar relacionada com alterações estruturais e/ ou funcionais. Nesse sentido tornou-se relevante a realização de estudos tanto a nível funcional como morfológico.

A análise dos dados ecocardiográficos e hemodinâmicos revelou-se extremamente útil na avaliação da lesão miocárdica, neste modelo animal. Tal como previsto, foi possível verificar, que 4 semanas após a administração da MCT, os animais doentes apresentavam claros sinais de desenvolvimento de HAP e IC ventricular direita.

Através da análise ecocardiográfica, observou-se a ocorrência de hipertrofia ventricular direita, dilatação do VD, com deslocamento do septo IV em direção ao VE, provocando

achatamento do VE. Estas alterações, descritas em diversos estudos^{62,166}, resultam numa profunda alteração na geometria do VD, comprometendo a sua capacidade funcional.

Para além destas alterações estruturais, foi possível verificar no grupo MCT, por análise ecocardiográfica, disfunções como ocorrência de insuficiência das válvulas pulmonar (com regurgitação de sangue da artéria pulmonar ao VD) e tricúspide (com regurgitação de sangue à aurícula direita) e uma elevação da PAPm. Estas alterações são resultado do aumento da resistência vascular pulmonar, e conduzem à redução da capacidade de ejeção ventricular.

A indução de alterações no fluxo sanguíneo, a nível pulmonar, conduz a modificações adaptativas a nível ventricular direito. Contudo, a persistência da sobrecarga do VD acaba por induzir alterações estruturais irreversíveis, que culminam num estado de falência ventricular⁶².

No desenvolvimento da IC uma das alterações hemodinâmicas é o aumento gradual da pressão diastólica final e diminuição da pressão sistólica ventricular final.

Farahmand *et al* (2004)¹⁶⁷, usando a mesma dose de MCT usada neste estudo, constatarem que após 2 duas semanas da administração desta droga, a pressão intraventricular sistólica direita e a pressão diastólica final no VD estavam aumentadas. Associaram este aumento, à ativação de um mecanismo compensatório, de forma a tentar contrariar o aumento da resistência vascular pulmonar. Entretanto, após 6 semanas verificaram que a pressão intraventricular sistólica direita estava reduzida e a pressão diastólica final do VD progressivamente aumentada, evidenciando um estado de IC avançado.

Zhang *et al* (2004)¹⁶⁸, usando o mesmo modelo, verificaram às 4 semanas um aumento da pressão sistólica no VD, no grupo MCT, em 128% comparativamente com o grupo de animais não doentes.

No nosso estudo, às 4 semanas de tratamento foi possível verificar no grupo MCT uma elevação notória na pressão sistólica do VD, na pressão telediastólica e na velocidade de contração (dp/dt_{Max}). Este aumento pode estar associado à elevação da pós-carga no VD que consequentemente potenciou um processo hipertrófico, no sentido de aumentar a força contráctil da parede muscular do VD. Possivelmente os animais doentes, analisados às 4 semanas, encontravam-se numa fase compensatória da doença, não se encontrando ainda num estado avançado de falência ventricular direita¹²⁵.

A nível ventricular esquerdo, as alterações hemodinâmicas observadas no grupo MCT, permitem-nos comprovar o comprometimento da função do VE, presumivelmente associado às alterações geométricas no VD, descritas anteriormente. A queda na pressão sistólica e no dp/dt_{Max} refletem a diminuição da pré-carga no VE dos animais doentes, característica da HAP.

À semelhança dos resultados obtidos em modelos animais e humanos de IC ventricular esquerda^{134,140}, com a aplicação de tratamento crónico com NRG-1 foi evidente uma melhoria significativa em todos os parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos analisados em relação aos animais não tratados, o que reflete um papel preponderante do sistema NRG-1/ErbB na prevenção do aparecimento de disfunção ventricular direita, associada à HAP.

Esta melhoria nos parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos nos animais do grupo MCT+NRG-1, quando comparados com os do grupo MCT, por um lado pode estar relacionada com a redução da lesão pulmonar e consequente decréscimo na resistência vascular pulmonar, induzida pela NRG-1 (efeito a nível pulmonar). Por outro lado, esta melhoria pode também estar diretamente relacionada com o efeito a nível dos cardiomiócitos (efeito cardíaco).

A disfunção endotelial, a nível dos vasos pulmonares, parece ser o principal fator contribuinte para o aumento da resistência vascular pulmonar, resultando num estado de HAP¹⁶⁷

O endotélio vascular que reveste o lúmen de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa, estrategicamente posicionada entre a circulação e a restante parede vascular. Este desempenha um importante efeito regulador do tónus vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas e sinais humorais, ou de estímulos químicos da corrente sanguínea, transmitindo-os às células musculares lisas¹⁶⁹.

De forma a avaliar o grau de disfunção endotelial a nível pulmonar foi possível efetuar o estudo da capacidade de relaxamento de anéis da artéria pulmonar. Quando estimulados com acetilcolina (importante vasodilatador dependente do endotélio), os anéis da artéria pulmonar de animais do grupo MCT, anteriormente contraídos por ação da fenileferina, apresentaram uma resposta reduzida, confirmando a presença de disfunção endotelial nestes vasos. Relativamente às artérias pulmonares de animais do grupo MCT+NRG-1, estas apresentaram uma resposta significativamente superior em relação ao grupo MCT, indicando que o tratamento crónico com NRG-1 tem um papel importante na preservação da função endotelial dos vasos pulmonares.

Um dos mecanismos que pode estar subjacente a estes efeitos relaciona-se com os níveis de NO. A acetilcolina, interagindo com os recetores muscarínicos da célula endotelial intacta, tem a capacidade de estimular a libertação de NO. Este difunde-se para a musculatura lisa onde vai causar relaxamento muscular, através da redução dos níveis de Ca^{2+} intracelulares. Brunner *et al*¹⁵² e Mathew *et al*¹⁷⁰, ao estudarem o modelo de HAP induzida pela MCT, observaram que após duas semanas da administração da droga, ocorreu disfunção endotelial da vasculatura pulmonar, resultante da inibição da libertação de NO. Embora não existam dados publicados relativos ao

papel da NRG-1 na modulação da capacidade vasomotora dos vasos pulmonares, Brero *et al*¹⁷¹ (2010) verificaram que a NRG-1 β aumenta os níveis de NO, através do aumento da fosforilação da eNOs em cardiomiócitos de Rato. Assim, tendo em consideração as interações entre o sistema NRG-1/ErbB e a sinalização muscarínica antiadrenérgica (descritos no capítulo I) e os resultados obtidos em estudos com cardiomiócitos, a melhoria da capacidade de relaxamento verificada em artérias pulmonares de animais doentes, tratados com NRG-1, pode estar associada a uma maior biodisponibilidade de NO nestes animais.

Com o intuito de tentar compreender o mecanismo de atuação do sistema NRG-1/ErbB, na redução da disfunção pulmonar e cardiovascular, procedemos a uma série de estudos morfométricos e histológicos.

Ao descrever as alterações provocadas pela administração de MCT, Daicho *et al*⁶² publicaram um estudo que apresenta os resultados do acompanhamento de ratos até às 8 semanas. Este grupo de investigadores observou, em termos morfológicos, um aumento significativo no peso do VD, na razão peso do VD/ peso corporal, e na razão peso do pulmão/ peso corporal, 4 semanas após administração de MCT. Para além deste estudo, este aumento significativo de peso do VD e pulmão nos animais MCT, tem sido descrito por vários investigadores que tem usado o mesmo modelo animal^{170,172-173}. À semelhança destes trabalhos, também observámos um aumento no peso do coração, associado a um aumento de peso no VD, e o aumento de peso do pulmão nos animais doentes não tratados. Com o tratamento crónico com NRG-1 observou-se uma redução destes pesos, confirmando-se os resultados dos estudos funcionais que apontam para os efeitos benéficos da NRG-1 tanto a nível da congestão pulmonar como da hipertrofia ventricular direita.

Os resultados da análise histológica do VD vieram reforçar os resultados morfométricos e funcionais. Através da análise do diâmetro e área de secção dos cardiomiócitos, e da percentagem de fibrose, verificámos que os animais MCT apresentavam hipertrofia e fibrose no tecido ventricular direito. Este estado de hipertrofia está atenuado nos animais tratados com NRG-1. Nos animais do grupo MCT+NRG-1, a NRG-1 para além de demonstrar ter um efeito anti-hipertrófico ao nível dos cardiomiócitos demonstrou ter também um efeito antifibrótico.

A NRG-1 tem demonstrado promover a proliferação e diferenciação de cardiomiócitos adultos, inibir vias apoptóticas, promover a sobrevivência celular e o contacto entre células. Esta atua, a nível cardíaco, através do ErbB2 e ErbB4 estimulando vias de sinalização como a da MAPK

e do PI-3K. A ativação da via MAPK pela NRG-1 tem sido associada ao aumento da síntese proteica e expressão de genes de hipertrofia. Por outro lado a via PI-3K parece estar associada à proteção dos cardiomiócitos contra a apoptose, assim como à regulação do metabolismo celular¹⁴⁰. Estudos *in vitro*¹⁷⁴ têm demonstrado que a NRG-1 induz hipertrofia dos cardiomiócitos através da ativação da via da MAPK. Curiosamente esse efeito hipertrófico nunca foi confirmado *in vivo*, porém, no nosso trabalho demonstrámos que na presença de HAP, a NRG-1 teve efeitos anti-hipertróficos *in vivo*.

O mecanismo preciso responsável pela atuação da NRG-1 ao nível da fibrose também não está esclarecido. No entanto, a síntese de NO, estimulada pela ativação do sistema NRG-1/ErbB, pode estar envolvida no controlo da fibrose. Foi anteriormente descrito que o aumento dos níveis de NO pode atenuar o desenvolvimento de fibrose através da regulação dos níveis de renina (considerada um mediador pró-fibrótico)¹⁷⁵.

A nível da histologia da artéria pulmonar, observou-se um espessamento da camada média no grupo MCT, o que está de acordo com estudos anteriormente realizados¹⁷⁰. Este espessamento foi também atenuado nas artérias de animais do grupo MCT+NRG-1, o que pode ser explicado pela capacidade da NRG-1 inibir a proliferação de células musculares lisas¹⁴⁵. Segundo o estudo publicado por Clemente *et al*¹⁴⁵, a NRG-1 para além dos seus efeitos antiateroscleróticos, tem a capacidade de reduzir a formação de neoíntima. Estes investigadores, ao estudarem a carótida de ratos, verificaram que a indução de lesão vascular provoca um aumento dos níveis de NRG-1 β . Todavia, ao administrarem NRG-1 exógena, verificaram uma atenuação da formação da neoíntima em 50%, através da inibição da proliferação e diminuição da migração de células musculares lisas. Este efeito antiproliferativo da NRG-1, sobre as células musculares lisas, parece estar associado ao facto desta proteína ter a capacidade de inibir a fosforilação do PDGF, o qual tem a capacidade de estimular a proliferação das células musculares lisas.

A nível molecular verificou-se que a expressão de ARNm da NRG-1 estava aumentada no VD dos animais MCT. Este facto permite-nos confirmar que o sistema NRG-1 desempenha um importante papel na fisiopatologia da HAP e IC ventricular direita, uma vez que este é ativado no estado de doença. Este aumento da NRG-1, no VD de animais doentes, pode estar associado a um processo adaptativo, tal como se tem verificado na IC ventricular esquerda¹²⁵.

Verificou-se ainda que, nos animais tratados cronicamente com NRG-1, a expressão de NRG-1 se apresentava diminuída em relação aos animais não tratados. Esta diminuição pode estar associada à melhoria da capacidade funcional do VD nos animais tratados, não estando presentes os estímulos que desencadeiam a sua produção endógena. Contudo, nesta redução dos níveis de NRG-1, pode ainda estar implícito um mecanismo de feedback negativo.

Relativamente aos níveis de ET-1 e BNP no VD, verificou-se uma expressão aumentada no tecido cardíaco de animais do grupo MCT, estando concordante com os resultados funcionais e histológicos observados. Tanto a ET-1 como o BNP, dois marcadores de sobrecarga e hipertrofia ventriculares, tem sido descritos como estando aumentados no modelo de HAP induzido pela MCT¹⁷⁶⁻¹⁷⁷. O BNP é produzido principalmente ao nível dos ventrículos, em resposta ao estiramento excessivo das células musculares cardíacas (cardiomiócitos), provocado por stress ou aumento da pressão ventricular. Este tem sido um dos importantes biomarcadores usados no diagnóstico de IC, uma vez que a concentração plasmática de BNP é significativamente alta em doentes com IC tanto esquerda como direita¹⁷⁶. Quanto à ET-1, Jasmin *et al*¹⁷⁷ verificaram que 3 semanas após a administração de MCT, os níveis de ET-1 estavam aumentados 198% no VD em relação ao grupo controlo, demonstrando assim uma associação entre a HAP e hipertrofia ventricular direita induzida pela MCT com o aumento dos níveis de ET-1.

Nos animais tratados com NRG-1, não encontramos diferenças significativas no que respeita à expressão de ET-1 e verificámos apenas um ligeiro aumento do BNP em relação aos animais do grupo CTRL. Estas diferenças significativas em relação ao aumento considerável dos níveis de ambos os agentes nos animais doentes poderão ser explicadas, pelo menos em parte, pelos efeitos benéficos da NRG-1 a nível hemodinâmico.

No VD foi determinada também a expressão de IL6 e TNF- α , no entanto não foi possível verificar diferenças significativas na expressão génica destes agentes inflamatórios. Sabe-se que os processos inflamatórios contribuem para o desenvolvimento de HAP e IC. No modelo animal de MCT, à semelhança do que acontece na HAP idiopática, tanto a quantidade como a atividade das células inflamatórias estão aumentadas. O TNF- α e a IL6, libertados por macrófagos e neutrófilos, produzem a amplificação da resposta inflamatória, podendo ser usados como indicadores do estado inflamatório³². A presença de níveis séricos aumentados de IL6 e TNF- α é frequentemente observada no modelo MCT¹⁷⁸⁻¹⁷⁹. Contudo, uma vez que neste estudo não observamos diferenças nos níveis de ambos os agentes no VD, não foi possível inferir sobre o papel da NRG-1 a nível do estado inflamatório do VD.

Quanto ao estudo molecular da NRG-1 a nível pulmonar, não se observaram diferenças significativas na expressão génica desta proteína. Apesar deste resultado, os dados funcionais, morfométricos e histológicos, anteriormente descritos, apontam para um importante papel da NRG-1 a nível da vasculatura pulmonar. Embora não esteja ainda esclarecido o seu mecanismo de atuação, a administração exógena de NRG-1 reduziu o grau de congestão pulmonar e melhorou a função vascular pulmonar.

Ainda no pulmão, relativamente à citocinas inflamatórias, não se verificaram alterações na expressão de TNF- α , contudo no que diz respeito à expressão de IL6 verificou-se um aumento significativo no grupo MCT, o que está de acordo com dados da literatura¹⁷⁹. Este aumento na IL6 foi ligeiramente atenuado no grupo MCT+NRG-1, o que pode estar associado a um possível efeito da NRG-1 a nível dos processos inflamatório. Esta atenuação é mais um indício do papel benéfico da NRG-1 a nível pulmonar.

Um dos objetivos do nosso trabalho centrava-se no estudo da interação da ET-1 com a NRG-1. Como referimos anteriormente, no VD, a nível molecular verificamos que nos animais MCT, o aumento da ET-1 é acompanhado pelo aumento da NRG-1, enquanto nos animais MCT+NRG-1, o decréscimo da NRG-1 é acompanhado pela reversão da ET-1. Este resultado pode estar associado ao facto da libertação endotelial de NRG-1 ser estimulada pela ET-1, como descrito por Lemmens *et al* (2006)¹⁵⁰. Ainda no sentido de estudar esta interação, foi possível ao longo deste estudo, a análise da expressão génica de NRG-1 em animais MCT tratado com Bosentan. O Bosentan consiste numa das opções terapêuticas da HAP, aprovadas recentemente pela FDA. Este fármaco consiste num antagonista oral dos recetores da ET-1 (ET-1_A e ET-1_B) e tem um papel extremamente importante na prevenção da HAP, na remodelagem vascular, e na hipertrofia ventricular direita¹⁸⁰. No nosso trabalho, verificamos que a administração crónica do Bosentan nos animais doentes induz uma redução na expressão de NRG-1. Esta redução pode estar associada a um decréscimo nos níveis de ET-1, mas também à melhoria da condição clínica, o que realça ainda mais a importância do estudo do sistema NRG-1/ErbB no contexto de HAP e progressão para a IC direita.

Após esta extensa reflexão dos resultados obtidos, deparamo-nos com algumas dúvidas, que levantam a necessidade de realização de estudos futuros para tentar compreender o exato papel da NRG-1 no mecanismo de HAP e IC ventricular direita.

Uma das principais dúvidas, prendesse com o facto de ao longo deste estudo não ser claro, se a NRG-1 atua simultaneamente ao nível da vasculatura pulmonar e do coração, ou se, ao melhorar apenas a função das artérias pulmonares, atenua o grau de lesão cardíaca, embora os resultados pareçam apontar para uma ação benéfica conjunta ao nível cardíaco e pulmonar. Outra das questões que se mantém é, “como é que a NRG-1 atua exatamente neste modelo de HAP?”. Na tentativa de tentar responder a estas questões, parece relevante, no futuro, a realização de vários estudos, principalmente:

- Análise da expressão dos recetores da NRG-1 e dos seus níveis de fosforilação, na tentativa de confirmar a ativação deste sistema, tanto a nível pulmonar como cardíaco;

- Análise da histologia do pulmão, dos animais estudados, de forma a tentar compreender de que forma é que a NRG-1 reduziu a congestão pulmonar;

- Tentar diferenciar os efeitos a nível vascular pulmonar, dos efeitos a nível cardíaco, através do estudo em modelos de *banding* cirúrgico da artéria pulmonar. Com a técnica de *banding* é possível submeter o coração a uma sobrecarga constante sem a ocorrência de alterações ao nível da vasculatura pulmonar, permitindo desta forma, discriminar os efeitos exatos da NRG-1 ao nível do VD;

- Estudo das vias de sinalização envolvidas nos efeitos benéficos do sistema NRG-1/ErbB.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou, através de um conjunto integrado de estudos funcionais, morfométricos, histológicos e moleculares, que:

- 1) o sistema da NRG-1 está implicado na fisiopatologia da HAP;
- 2) o tratamento crónico com NRG-1 reduz significativamente o grau de HAP, a hipertrofia e disfunção do VD, bem como, a ativação de genes associados a sobrecarga e hipertrofia ventriculares;
- 3) os níveis de NRG-1 não se encontram aumentados no ventrículo direito de animais com HAP e tratados com Bosentan, ao contrário do que acontece nos animais não tratados.

Estes resultados apontam para o importante papel fisiopatológico e terapêutico do sistema NRG-1/ErbB na HAP e na progressão para a IC ventricular direita. Adicionalmente, e uma vez que o Bosentan constitui uma das terapêuticas aprovadas para o tratamento da HAP, os achados reforçam a noção da existência de interação entre os sistemas da ET-1 e da NRG-1 e sugerem um novo mecanismo que pode estar subjacente á ação terapêutica dos antagonistas dos recetores da ET-1 nesta síndrome.

Tendo em conta que atualmente a NRG-1 já está a ser usada em estudos clínicos com humanos, com IC ventricular esquerda, e que esta abordagem farmacológica parece ser bem tolerada pelos doentes, a administração desta proteína recombinante poderá constituir no futuro uma nova opção terapêutica no contexto da HAP e IC ventricular direita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliveira, A., *et al.* [Pulmonary arterial hypertension--experience of Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia]. *Rev Port Pneumol* **13**, 239-254 (2007).
2. D'Alonzo, G.E., *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* **115**, 343-349 (1991).
3. Humbert, M., *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 1023-1030 (2006).
4. Peacock, A.J., Murphy, N.F., McMurray, J.J., Caballero, L. & Stewart, S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **30**, 104-109 (2007).
5. Galie, N., *et al.* Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **25**, 2243-2278 (2004).
6. McLaughlin, V.V., *et al.* Prognosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **126**, 78S-92S (2004).
7. Rhodes, C.J., Davidson, A., Gibbs, J.S., Wharton, J. & Wilkins, M.R. Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther* **121**, 69-88 (2009).
8. Handoko, M.L., *et al.* Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart. *Eur Respir Rev* **19**, 72-82 (2010).
9. Reis, A., *et al.* [Guidelines for the management of pulmonary hypertension patients]. *Rev Port Cardiol* **29**, 253-289 (2010).
10. Simonneau, G. Second World Symposium on Pulmonary Hypertension. (Evian, France, 1998).
11. Simonneau, G., *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S43-S54 (2009).
12. Third World Symposium on Pulmonary Hypertension (Venice, Italy, 2003).
13. Fourth World Symposium on Pulmonary Hypertension (Danna Point, California, USA, 2008).
14. Rich, S., *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* **107**, 216-223 (1987).
15. Stricker, H., *et al.* Severe pulmonary hypertension: data from the Swiss Registry. *Swiss Med Wkly* **131**, 346-350 (2001).
16. Appelbaum, L., *et al.* Primary pulmonary hypertension in Israel: a national survey. *Chest* **119**, 1801-1806 (2001).
17. Jing, Z.C., *et al.* Registry and survival study in chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Chest* **132**, 373-379 (2007).
18. Reis, A. Recomendações para a abordagem clínica dos doentes com Hipertensão Pulmonar. in *XVI Reunião Nacional do NEDAI* (Évora, 2010).
19. Peacock, A.J. Primary pulmonary hypertension. *Thorax* **54**, 1107-1118 (1999).
20. Rubin, L.J. Primary pulmonary hypertension. *Chest* **104**, 236-250 (1993).
21. Humbert, M., *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, 13S-24S (2004).
22. Jeffery, T.K. & Morrell, N.W. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* **45**, 173-202 (2002).
23. Stenmark, K.R., Gerasimovskaya, E., Nemenoff, R.A. & Das, M. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* **122**, 326S-334S (2002).
24. Kerkela, E. & Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* **12**, 109-125 (2003).
25. Davie, N.J., *et al.* Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L668-678 (2004).

26. Cool, C.D., *et al.* Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* **155**, 411-419 (1999).
27. Morrell, N.W., *et al.* Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **54**, S20-31 (2009).
28. Kherbeck, N., *et al.* The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Rev Allergy Immunol* (2011).
29. Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B. & Voelkel, N.F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* **144**, 275-285 (1994).
30. Balabanian, K., *et al.* CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1419-1425 (2002).
31. McLaughlin, V.V. & McGoon, M.D. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **114**, 1417-1431 (2006).
32. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **22**, 358-363 (2003).
33. Tuder, R.M., *et al.* The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. *Clin Chest Med* **22**, 405-418 (2001).
34. Herve, P., *et al.* Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med* **22**, 451-458 (2001).
35. Michelakis, E.D., *et al.* Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* **105**, 244-250 (2002).
36. Gombert-Maitland, M. & Preston, I.R. Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension: new directions. *Semin Respir Crit Care Med* **26**, 394-401 (2005).
37. Christman, B.W., *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **327**, 70-75 (1992).
38. Klinger, J.R. The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* **28**, 143-167, ix (2007).
39. Forstermann, U., *et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**, 1121-1131 (1994).
40. Shaul, P.W., *et al.* Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**, 167-174 (1995).
41. Hampl, V. & Herget, J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**, 1337-1372 (2000).
42. Munzel, T., *et al.* Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* **108**, 2172-2183 (2003).
43. Krick, S., *et al.* Nitric oxide induces apoptosis by activating K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H184-193 (2002).
44. Pollman, M.J., Yamada, T., Horiuchi, M. & Gibbons, G.H. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* **79**, 748-756 (1996).
45. Ziche, M., *et al.* Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res* **80**, 845-852 (1997).
46. Mason, N.A., *et al.* High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol* **185**, 313-318 (1998).

47. Berger, R.M., Geiger, R., Hess, J., Bogers, A.J. & Mooi, W.J. Altered arterial expression patterns of inducible and endothelial nitric oxide synthase in pulmonary plexogenic arteriopathy caused by congenital heart disease. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1493-1499 (2001).
48. Xu, W., *et al.* Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* **18**, 1746-1748 (2004).
49. Galie, N., *et al.* Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **353**, 2148-2157 (2005).
50. Mikhail, G.W., *et al.* Clinical and haemodynamic effects of sildenafil in pulmonary hypertension: acute and mid-term effects. *Eur Heart J* **25**, 431-436 (2004).
51. Luscher, T.F. & Barton, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* **102**, 2434-2440 (2000).
52. Kawanabe, Y. & Nauli, S.M. Endothelin. *Cell Mol Life Sci* **68**, 195-203 (2011).
53. Benigni, A. Defining the role of endothelins in renal pathophysiology on the basis of selective and unselective endothelin receptor antagonist studies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **4**, 349-353 (1995).
54. Iwamuro, Y., *et al.* Activation of three types of voltage-independent Ca²⁺ channel in A7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca²⁺ channel blocker LOE 908. *Br J Pharmacol* **126**, 1107-1114 (1999).
55. Chua, B.H., Krebs, C.J., Chua, C.C. & Diglio, C.A. Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol* **262**, E412-416 (1992).
56. Hirata, Y., *et al.* Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* **91**, 1367-1373 (1993).
57. Masaki, T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 235-255 (1995).
58. Stewart, D.J., Levy, R.D., Cernacek, P. & Langleben, D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* **114**, 464-469 (1991).
59. Giaid, A., *et al.* Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* **328**, 1732-1739 (1993).
60. Channick, R.N., *et al.* Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **358**, 1119-1123 (2001).
61. Handoko, M.L., *et al.* Right ventricular pacing improves right heart function in experimental pulmonary arterial hypertension: a study in the isolated heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1752-1759 (2009).
62. Daicho, T., *et al.* Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* **32**, 1378-1384 (2009).
63. Kalogeropoulos, A.P., Vega, J.D., Smith, A.L. & Georgiopoulou, V.V. Pulmonary hypertension and right ventricular function in advanced heart failure. *Congest Heart Fail* **17**, 189-198 (2011).
64. Huang, H., Kamm, R.D. & Lee, R.T. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1-11 (2004).
65. Seixas-Cambao, M. & Leite-Moreira, A.F. Pathophysiology of chronic heart failure. *Rev Port Cardiol* **28**, 439-471 (2009).
66. Leite-Moreira, A.F., Abreu-Lima, C. & Cerqueira-Gomes, M. [Heart failure]. *Rev Port Cardiol* **23 Suppl 2**, II5 (2004).
67. Provencher, S., *et al.* Clinical challenges in pulmonary hypertension: Roger S. Mitchell lecture. *Chest* **128**, 622S-628S (2005).
68. Zahn, R., *et al.* An unusual cause of dyspnoea and pulmonary hypertension in a patient with a symptom history of 20 years--"Just do it again". *Clin Res Cardiol* **95**, 68-71 (2006).

69. Puri, A., McGoon, M.D. & Kushwaha, S.S. Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4**, 319-329 (2007).
70. Umar, S., *et al.* Novel approaches to treat experimental pulmonary arterial hypertension: a review. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 702836 (2010).
71. Chin, K.M. & Rubin, L.J. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **51**, 1527-1538 (2008).
72. Pan, L.C., Wilson, D.W. & Segall, H.J. Strain differences in the response of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats to monocrotaline induced pulmonary vascular disease. *Toxicology* **79**, 21-35 (1993).
73. Sager, J.S. & Ahya, V.N. Surgical therapies for pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med* **28**, 187-202, ix (2007).
74. Marsboom, G.R. & Janssens, S.P. Models for Pulmonary Hypertension. *Drug Discovery Today: Disease Models - Cardiovascular Disease* **1**, 289-296 (2004).
75. Robbins, I.M. Advancing therapy for pulmonary arterial hypertension: can animal models help? *Am J Respir Crit Care Med* **169**, 5-6 (2004).
76. Firth, A.L., Mandel, J. & Yuan, J.X. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Dis Model Mech* **3**, 268-273 (2010).
77. Millatt, L.J., *et al.* Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* **108**, 1493-1498 (2003).
78. Jones, A.E., *et al.* Inhibition of prostaglandin synthesis during polystyrene microsphere-induced pulmonary embolism in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L1072-1081 (2003).
79. Lai, Y.J., *et al.* Role of the prostanoid EP4 receptor in iloprost-mediated vasodilatation in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 188-196 (2008).
80. Lynch, D.A., Hirose, N., Cherniack, R.M. & Doherty, D.E. Bleomycin-induced lung disease in an animal model: correlation between computed tomography-determined abnormalities and lung function. *Acad Radiol* **4**, 102-107 (1997).
81. Curtis, J., Kim, G., Wehr, N.B. & Levine, R.L. Group B streptococcal phospholipid causes pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5087-5090 (2003).
82. Taraseviciene-Stewart, L., *et al.* Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L668-676 (2006).
83. Sullivan, C.C., *et al.* Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12331-12336 (2003).
84. West, J., *et al.* Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res* **94**, 1109-1114 (2004).
85. Said, S.I., *et al.* Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* **115**, 1260-1268 (2007).
86. Greenway, S., *et al.* S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am J Pathol* **164**, 253-262 (2004).
87. Pentassuglia, L. & Sawyer, D.B. The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart. *Exp Cell Res* **315**, 627-637 (2009).
88. Cote, G.M., Miller, T.A., Lebrasseur, N.K., Kuramochi, Y. & Sawyer, D.B. Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res* **311**, 135-146 (2005).
89. Peles, E. & Yarden, Y. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* **15**, 815-824 (1993).
90. Marchionni, M.A., *et al.* Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**, 312-318 (1993).

91. Falls, D.L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S. & Fischbach, G.D. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**, 801-815 (1993).
92. Lemmens, K., Doggen, K. & De Keulenaer, G.W. Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure. *Circulation* **116**, 954-960 (2007).
93. Harris, R.C., Chung, E. & Coffey, R.J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* **284**, 2-13 (2003).
94. Britsch, S. The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **190**, 1-65 (2007).
95. Falls, D.L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14-30 (2003).
96. Bao, J., Wolpowitz, D., Role, L.W. & Talmage, D.A. Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *J Cell Biol* **161**, 1133-1141 (2003).
97. Wang, J.Y., Miller, S.J. & Falls, D.L. The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* **276**, 2841-2851 (2001).
98. Holbro, T. & Hynes, N.E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 195-217 (2004).
99. Adlkofer, K. & Lai, C. Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* **29**, 104-111 (2000).
100. Garrett, T.P.J., *et al.* The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors. *Molecular cell* **11**, 495-505 (2003).
101. Li, Z., Mei, Y., Liu, X. & Zhou, M. Neuregulin-1 only induces trans-phosphorylation between ErbB receptor heterodimer partners. *Cellular Signalling* **19**, 466-471 (2007).
102. Rowinsky, E.K. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* **55**, 433-457 (2004).
103. Peles, E., *et al.* Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hereregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J* **12**, 961-971 (1993).
104. Berezov, A., *et al.* Disabling receptor ensembles with rationally designed interface peptidomimetics. *J Biol Chem* **277**, 28330-28339 (2002).
105. Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C. & Lemmon, M.A. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* **277**, 4704-4712 (2002).
106. Garratt, A.N., Ozcelik, C. & Birchmeier, C. ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 80-86 (2003).
107. Hynes, N.E., Horsch, K., Olayioye, M.A. & Badache, A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* **8**, 151-159 (2001).
108. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. & Hynes, N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**, 3159-3167 (2000).
109. Cho, H.-S., *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756-760 (2003).
110. Negro, A., Brar, B.K. & Lee, K.F. Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res* **59**, 1-12 (2004).
111. Bouyain, S., Longo, P.A., Li, S., Ferguson, K.M. & Leahy, D.J. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15024-15029 (2005).
112. Burgess, A.W., *et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **12**, 541-552 (2003).
113. Fuller, S.J., Sivarajah, K. & Sugden, P.H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 831-854 (2008).

114. Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-137 (2001).
115. Eto, K., Hommyo, A., Yonemitsu, R. & Abe, S.-i. ErbB4 signals Neuregulin1-stimulated cell proliferation and c-fos gene expression through phosphorylation of serum response factor by mitogen-activated protein kinase cascade. *Molecular and Cellular Biochemistry* **339**, 119-125 (2010).
116. Rodriguez-Viciana, P., *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532 (1994).
117. Peng, X., Chen, B., Lim, C.C. & Sawyer, D.B. The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: translating molecular mechanism into preventative medicine. *Mol Interv* **5**, 163-171 (2005).
118. Speyer, J. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical experience. *J Clin Oncol* **20**, 1156-1157 (2002).
119. Hedhli, N. & Russell, K.S. Cytostatic drugs, neuregulin activation of erbB receptors, and angiogenesis. *Curr Hypertens Rep* **12**, 411-417 (2010).
120. Meyer, D. & Birchmeier, C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**, 386-390 (1995).
121. Russell, K.S., Stern, D.F., Polverini, P.J. & Bender, J.R. Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis. *Am J Physiol* **277**, H2205-2211 (1999).
122. Camenisch, T.D., Schroeder, J.A., Bradley, J., Klewer, S.E. & McDonald, J.A. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nat Med* **8**, 850-855 (2002).
123. Crone, S.A., *et al.* ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* **8**, 459-465 (2002).
124. Ozcelik, C., *et al.* Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8880-8885 (2002).
125. Lemmens, K., Doggen, K. & Keulenaer, G.W. Neuregulin-1 and its potential role in the control of cardiac function. *Heart Fail Monit* **5**, 119-124 (2008).
126. Camprecios, G., *et al.* Expression, localization, and regulation of the neuregulin receptor ErbB3 in mouse heart. *J Cell Physiol* **226**, 450-455 (2011).
127. Erickson, S.L., *et al.* ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* **124**, 4999-5011 (1997).
128. Zhao, Y.Y., *et al.* Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* **273**, 10261-10269 (1998).
129. Sawyer, D.B., Zuppinger, C., Miller, T.A., Eppenberger, H.M. & Suter, T.M. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation* **105**, 1551-1554 (2002).
130. Kuramochi, Y., Guo, X. & Sawyer, D.B. Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 228-235 (2006).
131. Jiang, Z. & Zhou, M. Neuregulin signaling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* **7**, 42-47 (2010).
132. Xu, G., *et al.* Preventive effects of heregulin-beta1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Circ Res* **105**, 500-510 (2009).

133. Lemmens, K., Fransen, P., Sys, S.U., Brutsaert, D.L. & De Keulenaer, G.W. Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* **109**, 324-326 (2004).
134. Rohrbach, S., Niemann, B., Silber, R.E. & Holtz, J. Neuregulin receptors erbB2 and erbB4 in failing human myocardium -- depressed expression and attenuated activation. *Basic Res Cardiol* **100**, 240-249 (2005).
135. Perik, P.J., *et al.* Serum HER2 levels are increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **9**, 173-177 (2007).
136. Ky, B., *et al.* Neuregulin-1 beta is associated with disease severity and adverse outcomes in chronic heart failure. *Circulation* **120**, 310-317 (2009).
137. De Keulenaer, G.W., Doggen, K. & Lemmens, K. The vulnerability of the heart as a pluricellular paracrine organ: lessons from unexpected triggers of heart failure in targeted ErbB2 anticancer therapy. *Circ Res* **106**, 35-46 (2010).
138. Liu, X., *et al.* Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **48**, 1438-1447 (2006).
139. Gao, R., *et al.* A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **55**, 1907-1914 (2010).
140. Jabbour, A., *et al.* Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses. *Eur J Heart Fail* **13**, 83-92 (2011).
141. Yen, L., *et al.* Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* **19**, 3460-3469 (2000).
142. Bagheri-Yarmand, R., Vadlamudi, R.K., Wang, R.A., Mendelsohn, J. & Kumar, R. Vascular endothelial growth factor up-regulation via p21-activated kinase-1 signaling regulates heregulin-beta1-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **275**, 39451-39457 (2000).
143. Panutsopoulos, D., *et al.* Expression of heregulin in human coronary atherosclerotic lesions. *J Vasc Res* **42**, 463-474 (2005).
144. Sigala, F., *et al.* Heregulin, cysteine rich-61 and matrix metalloproteinase 9 expression in human carotid atherosclerotic plaques: relationship with clinical data. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **32**, 238-245 (2006).
145. Clement, C.M., *et al.* Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **44**, 303-312 (2007).
146. Kalinowski, A., *et al.* Metalloproteinase-dependent cleavage of neuregulin and autocrine stimulation of vascular endothelial cells. *FASEB J* **24**, 2567-2575 (2010).
147. Dammann, C.E., Nielsen, H.C. & Carraway, K.L., 3rd. Role of neuregulin-1 beta in the developing lung. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1711-1716 (2003).
148. Zscheppang, K., Liu, W., Volpe, M.V., Nielsen, H.C. & Dammann, C.E. ErbB4 regulates fetal surfactant phospholipid synthesis in primary fetal rat type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L429-435 (2007).
149. Purevdorj, E., *et al.* ErbB4 deletion leads to changes in lung function and structure similar to bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L516-522 (2008).
150. Lemmens, K., Segers, V.F., Demolder, M. & De Keulenaer, G.W. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem* **281**, 19469-19477 (2006).
151. Chung, K.Y. & Walker, J.W. Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol* **71**, 1494-1502 (2007).

152. Brunner, F. Cardiac endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Cardiovasc Res* **44**, 197-206 (1999).
153. Kay, J.M., Harris, P. & Heath, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **22**, 176-179 (1967).
154. Lalich, J.J. & Merkow, L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. *Lab Invest* **10**, 744-750 (1961).
155. Dumitrascu, R., *et al.* Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med* **8**, 25 (2008).
156. Plestina, R. & Stoner, H.B. Pulmonary oedema in rats given monocrotaline pyrrole. *J Pathol* **106**, 235-249 (1972).
157. Hardziyenka, M., Campian, M.E., de Bruin-Bon, H.A., Michel, M.C. & Tan, H.L. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiogr* **19**, 1272-1279 (2006).
158. Archer, S.L., Weir, E.K. & Wilkins, M.R. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* **121**, 2045-2066 (2010).
159. Lourenco, A.P., *et al.* Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1587-1594 (2006).
160. Fontes-Sousa, A.P., *et al.* Echocardiographic evaluation including tissue Doppler imaging in New Zealand white rabbits sedated with ketamine and midazolam. *Vet J* **181**, 326-331 (2009).
161. Nesbitt, G.C., Mankad, S. & Oh, J.K. Strain imaging in echocardiography: methods and clinical applications. *Int J Cardiovasc Imaging* **25 Suppl 1**, 9-22 (2009).
162. Lourenco, A.P., *et al.* A Western-type diet attenuates pulmonary hypertension with heart failure and cardiac cachexia in rats. *J Nutr* **141**, 1954-1960 (2011).
163. Delannoy, E., *et al.* Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* **85**, 582-592 (2010).
164. Falcao-Pires, I., *et al.* Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H2007-2014 (2009).
165. Aziz, S.M., *et al.* Oxidative stress mediates monocrotaline-induced alterations in tenascin expression in pulmonary artery endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 775-787 (1997).
166. Guglin, M. & Khan, H. Pulmonary hypertension in heart failure. *J Card Fail* **16**, 461-474 (2010).
167. Farahmand, F., Hill, M.F. & Singal, P.K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* **260**, 21-29 (2004).
168. Zhang, T.T., Cui, B. & Dai, D.Z. Downregulation of Kv4.2 and Kv4.3 channel gene expression in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rat. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 226-230 (2004).
169. Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. & Taddei, S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* **157**, 527-536 (2009).
170. Mathew, R., Zeballos, G.A., Tun, H. & Gewitz, M.H. Role of nitric oxide and endothelin-1 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* **30**, 739-746 (1995).
171. Brero, A., *et al.* Neuregulin-1beta1 rapidly modulates nitric oxide synthesis and calcium handling in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **88**, 443-452 (2010).
172. Henriques-Coelho, T., *et al.* Endogenous production of ghrelin and beneficial effects of its exogenous administration in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2885-2890 (2004).

173. Henriques-Coelho, T., *et al.* Thymulin inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension modulating interleukin-6 expression and suppressing p38 pathway. *Endocrinology* **149**, 4367-4373 (2008).
174. Baliga, R.R., *et al.* NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol* **277**, H2026-2037 (1999).
175. Chatziantoniou, C., *et al.* Regulation of renin release is impaired after nitric oxide inhibition. *Kidney Int* **49**, 626-633 (1996).
176. Bhatia, V., Nayyar, P. & Dhindsa, S. Brain natriuretic peptide in diagnosis and treatment of heart failure. *J Postgrad Med* **49**, 182-185 (2003).
177. Jasmin, J.F., Cernacek, P. & Dupuis, J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clin Sci (Lond)* **105**, 647-653 (2003).
178. Wang, Y., *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in a rat model. *Respir Res* **12**, 26 (2011).
179. Steiner, M.K., *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res* **104**, 236-244, 228p following 244 (2009).
180. Schuurin, M.J., Vis, J.C., Duffels, M.G., Bouma, B.J. & Mulder, B.J. Adult patients with pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease: a review on advanced medical treatment with bosentan. *Ther Clin Risk Manag* **6**, 359-366 (2010).

ANEXO I

PUBLICAÇÕES, COMUNICAÇÕES E PROJETOS

1. PUBLICAÇÕES

1.1 ABSTRACTS

- ✓ **Maia-Rocha C**, Mendes-Ferreira P, Adão R, Lourenço AP, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin increased expression and its modulation by bosentan in pulmonary hypertension*. IJUP' 11 – 4th meeting of young researchers at university of Porto. Portugal. 2011. Abstract book: 518;
- ✓ Mendes-Ferreira P, **Maia-Rocha C**, Adão R, Silva M, Lourenço AP, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin attenuates right ventricular hypertrophy and dysfunction in an experimental model of pulmonary hypertension*. IJUP' 11 – 4th meeting of young researchers at university of Porto. Portugal. 2011. Abstract book: 220;
- ✓ Brás-Silva C, **Maia-Rocha C**, Mendes-Ferreira P, Adão R, Lourenço AP, Leite-Moreira AF. *Aumento da expressão génica de neuregulina e sua modulação pelo bosentan na hipertensão pulmonar*. Revista Portuguesa de Cardiologia 2011; volume 30 (Supl.I): I-85;
- ✓ Mendes-Ferreira P, **Maia-Rocha C**, Adão R, Silva M, Mendes MJ, Lourenço AP, Cerqueira RJ, Castro-Chaves P, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin attenuates right ventricular hypertrophy and dysfunction in an experimental model of pulmonary hypertension*. Yes Meeting' 11 – 6th young european scientist meeting. Porto, Portugal. 2011. Abstract book: Ps 53

1.2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

- ✓ Luísa Lopes-Conceição, Marina Dias-Neto, Carmen Brás-Silva, Ana Patrícia Fontes-Sousa, Pedro Mendes-Ferreira, **Carolina Maia-Rocha**, Tiago Henriques-Coelho, Gilles de Keulenaer, Adelino F. Leite-Moreira. *Sistema Neuregulina1/ErbB- Importância no Controlo da Função Cardíaca*. *Ata Médica Portuguesa*. Artigo de revisão (aceite para publicação);
- ✓ **Maia-Rocha C**, Mendes-Ferreira P, Adão R, Gilles de Keulenaer, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin-1 and ErbB receptors: The basic research of the role of Neuregulin-1/ErbB system*. Artigo de revisão (em fase de submissão).

2. COMUNICAÇÕES

2.1 COMUNICAÇÕES ORAIS

- ✓ Mendes-Ferreira P, **Maia-Rocha C**, Adão R, Silva M, Lourenço AP, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin attenuates right ventricular hypertrophy and dysfunction in an experimental model of pulmonary hypertension*. IJUP' 11 – 4th meeting of young researchers at university of Porto. Portugal. 2011;
- ✓ Carmen Brás Silva, Ana Patrícia Fontes de Sousa, Mónica Almeida, Sónia Pinho, Cláudia Moura, Ana Pires, José Carlos Areias (Pedro Mendes Ferreira, **Carolina Maia Rocha**, Rui Adão, Maria Silva, Maria José Mendes, André Lourenço, Adelino Leite Moreira). *Bolsa de Estudo João Porto - O papel do sistema da neuregulina na fisiopatologia da hipertensão pulmonar e na progressão para a insuficiência cardíaca*. XXXII Congresso Português de Cardiologia. 8-10 de abril, 2011. Lisboa, Portugal.

2.2 COMUNICAÇÕES EM PAINEL (POSTERS)

- ✓ **Maia-Rocha C**, Mendes-Ferreira P, Adão R, Lourenço AP, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin increased expression and its modulation by bosentan in pulmonary hypertension*. IJUP' 11 – 4th meeting of young researchers at university of Porto. 17-18 de fevereiro, 2011. Porto, Portugal;
- ✓ Brás-Silva C, **Maia-Rocha C**, Mendes-Ferreira P, Adão R, Lourenço AP, Leite-Moreira AF. *Aumento da expressão génica de neuregulina e sua modulação pelo bosentan na hipertensão pulmonar*. XXXII Congresso Português de Cardiologia. 8-10 de abril, 2011. Lisboa, Portugal;
- ✓ Mendes-Ferreira P, **Maia-Rocha C**, Adão R, Silva M, Mendes MJ, Lourenço AP, Cerqueira RJ, Castro-Chaves P, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. *Neuregulin attenuates right ventricular hypertrophy and dysfunction in an experimental model of pulmonary hypertension*. Yes Meeting' 11 – 6th young european scientist meeting. 16-18 September, 2011. Porto, Portugal.

3. PROJETOS

- ✓ Membro da equipa de investigação do projeto intitulado "ErbB receptor stimulation - a therapeutic approach in pulmonary hypertension" da autoria de Brás-Silva C, Lourenço AP, Mendes-Ferreira P, **Maia-Rocha C**, Adão R, Moura C, Pinho S, Pires A, Silva M, Fontes-Sousa AP, Areias JC, Leite-Moreira AF.